

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



PAPEL CENTRAL DE LOS CITOCROMOS P450 EN EL CATABOLISMO  
DEL COLESTEROL Y SU REGULACIÓN EN MICOBACTERIAS

TESIS DOCTORAL DE:  
**ESTHER GARCÍA FERNÁNDEZ**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
**JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ**  
**BEATRIZ GALÁN SICILIA**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**

**PAPEL CENTRAL DE LOS CITOCROMOS P450 EN EL  
CATABOLISMO DEL COLESTEROL Y SU REGULACIÓN EN  
MICOBACTERIAS.**

**ESTHER GARCÍA FERNÁNDEZ**

**MADRID, 2013**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**PAPEL CENTRAL DE LOS CITOCROMOS P450 EN EL CATABOLISMO  
DEL COLESTEROL Y SU REGULACIÓN EN MICOBACTERIAS.**

**ESTHER GARCÍA FERNÁNDEZ**

DIRECTORES:

**Dr. JOSÉ LUIS GARCÍA LÓPEZ**

**Dra. BEATRIZ GALÁN SICILIA**

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



**MADRID, 2013**



## **ABREVIATURAS**

<b>A</b>	Adenina
<b>A600</b>	Densidad óptica medida a 600nm
<b>aa</b>	Aminoácido(s)
<b>AD</b>	4-androstadien-3,17-diona
<b>ADD</b>	1,4-androstadien-3,17-diona
<b>Ap<sup>R</sup></b>	Resistencia a ampicilina
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>C</b>	Citosina
<b>°C</b>	Grado centígrado
<b>cDNA</b>	DNA complementario
<b>Ci</b>	Curio
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>Da</b>	Dalton
<b>dATP</b>	Desoxiadenosina 5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	Desoxicitidina 5'-trifosfato
<b>DEPC</b>	dietilpirocarbonato
<b>dGTP</b>	Desoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>dTTP</b>	Desoxitimidina 5'-trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido.
<b>G</b>	Guanina
<b>Gm<sup>R</sup></b>	Resistencia a gentamicina
<b>h</b>	Hora
<b>6His</b>	Secuencia de aminoácidos compuesta por 6 histidinas
<b>HTH</b>	Motivo hélice-giro-hélice
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación aparente
<b>kDa</b>	1000 Dalton
<b>Km<sup>R</sup></b>	Resistencia a kanamicina
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>p/v</b>	Relación peso/volumen
<b>MβCD</b>	Metil-β-ciclodextrina
<b>min</b>	Minuto
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NAD</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido

<b>NADH+H+</b>	Nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
<b>NADP</b>	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido
<b>NADPH+H+</b>	Fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
<b>NCBI</b>	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>nt</b>	Nucleótido(s)
<b>p/v</b>	Relación peso-volumen
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción de amplificación en cadena con DNA Polimerasa termorresistente
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>RBS</b>	Secuencia de unión al ribosoma
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>mRNA</b>	RNA mensajero
<b>RNAP</b>	RNA polimerasa
<b>RNA<sup>t</sup></b>	RNA de transferencia
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reacción de retrotranscripción acoplada a PCR
<b>σ</b>	Factor sigma de la RNA polimerasa
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>T</b>	Timina
<b>TAE</b>	Tampón Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>TE</b>	Tampón Tris-EDTA
<b>Tris</b>	Tri(hidroximetil)aminometano
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática
<b>UTP</b>	Uridina trifosfato
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Voltio
<b>v/v</b>	Relación volumen-volumen

#### ABREVIATURAS PARA AMINOÁCIDOS:

<b>Ala (A):</b> Alanina	<b>Gly (G):</b> Glicina	<b>Pro (P):</b> Prolina
<b>Arg (R):</b> Arginina	<b>His (H):</b> Histidina	<b>Ser (S):</b> Serina
<b>Asn (N):</b> Asparragina	<b>Ile (I):</b> Isoleucina	<b>Thr (T):</b> Treonina
<b>Asp (D):</b> Aspártico	<b>Leu (L):</b> Leucina	<b>Trp (W):</b> Triptófano
<b>Cys (C):</b> Cisteína	<b>Lys (K):</b> Lisina	<b>Tyr (Y):</b> Tirosina
<b>Gln (Q):</b> Glutamina	<b>Met (M):</b> Metionina	<b>Val (V):</b> Valina
<b>Glu (E):</b> Glutámico	<b>Phe (F):</b> Fenilalanina	

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

<b>I. SUMMARY</b>	1
1. Introducción	3
2. Objectives	6
3. Results	7
4. Discussion	10
5. Conclusions	12
6. References	12
<b>II. INTRODUCCIÓN</b>	15
<b>1. El colesterol y los compuestos esteroideos</b>	17
1.1. Los esteroideos y esteroides	17
1.2. Importancia de los esteroideos como contaminantes ambientales	20
1.3. Interés industrial y biotecnológico de los esteroideos	21
<b>2. Degradación bacteriana de compuestos esteroideos</b>	23
2.1. Degradación aeróbica de esteroideos	25
2.2. Degradación aeróbica del colesterol	25
2.3. Degradación anaeróbica de esteroideos	29
<b>3. Mecanismos de transporte del colesterol</b>	30
<b>4. Regulación de la ruta de degradación del colesterol</b>	31
<b>5. Citocromos P450 y su relación con los esteroideos</b>	35
5.1. Ciclo catalítico y propiedades espectroscópicas de los citocromos P450	38
5.2. Principales reacciones de los citocromos P450	40
5.3. Sistemas redox que acompañan a los citocromos P450	41
<b>6. Degradación aeróbica del colesterol en <i>Mycobacterium</i></b>	43
<b>III. OBJETIVOS</b>	47
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b>	51
<b>1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos</b>	53
<b>2. Medios y condiciones de cultivo</b>	56
2.1. Medios de cultivo empleados para <i>E. coli</i>	56
2.2. Medios de cultivo empleados para <i>M. smegmatis</i>	57
2.3. Protocolo de disolución de esteroideos	57
2.4. Antibióticos	58
2.5. Condiciones de cultivo	58
2.6. Conservación de las cepas bacterianas	59
<b>3. Experimentos de transferencia genética</b>	59



## Índice

3.1. Transformación de células de <i>E. coli</i>	59
3.2. Transformación de células de <i>M. smegmatis</i>	59
3.2.1. Preparación de células electrocompetentes de <i>M. smegmatis</i>	59
3.2.2. Transformación de células de <i>M. smegmatis</i> mediante electroporación	60
<b>4. Técnicas de manipulación de DNA</b>	61
4.1. Electroforesis en geles de agarosa	61
4.2. Extracción DNA cromosómico de <i>M. smegmatis</i>	62
4.3. Aislamiento de DNA plasmídico en <i>E.coli</i> y <i>M. smegmatis</i>	62
4.4. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)	63
4.4.1. PCR de colonia en <i>E. coli</i>	63
4.4.2. PCR de colonia o de cultivo líquido en <i>M. smegmatis</i> .	63
4.5. Secuenciación de DNA	64
4.6. Construcción de mutantes por delección mediante doble recombinación homóloga en <i>M. smegmatis</i>	64
<b>5. Técnicas de manipulación de RNA</b>	67
5.1. Extracción de RNA de micobacterias	67
5.2. Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)	68
5.3. PCR en tiempo real (qRT-PCR)	69
<b>6. Técnicas de manipulación de proteínas</b>	70
6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	70
6.2. Obtención de extractos protéicos de <i>M. smegmatis</i>	70
6.3. Sobreproducción y purificación de los citocromos P450 CYP125 y CYP142	71
6.4. Sobreproducción y purificación de la proteína KstR	72
6.5. Técnica de <i>Western blot</i>	73
<b>7. Ensayos enzimáticos de actividad monooxigenasa</b>	74
<b>8. Ensayos de unión DNA-proteína</b>	75
8.1. Marcaje de sondas con <sup>32</sup> P	75
8.2. Ensayos de retardo en gel	76
8.3. Ensayos de transcripción in vitro	77
<b>9. Técnicas cromatográficas</b>	78
9.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	78
9.2. Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS)	78
<b>10. Dicroísmo circular (CD)</b>	80
<b>11. Ultracentrifugación analítica</b>	80
<b>12. Cristalización de las proteínas Cyp125A3 y Cyp142A2</b>	81
<b>13. Análisis bioinformáticos</b>	81

<b>V. RESULTADOS</b>	83
<b>1. Caracterización de los citocromos P450 que catalizan el primer paso de degradación de la cadena lateral del colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc<sup>2</sup> 155</b>	85
1.1. Identificación de los citocromos P450 implicados en la degradación de colesterol en <i>M. smegmatis</i>	85
1.2. Caracterización biofísica y bioquímica del citocromo P450 CYP125A3 de <i>M. smegmatis</i>	91
1.2.1. Clonación, expresión heteróloga y purificación de CYP125A3	91
1.2.2. Caracterización espectroscópica del citocromo CYP125A3	93
1.2.2.1. Propiedades espectroscópicas del citocromo CYP125A3	93
1.2.2.2. Estudios de unión a ligandos del CYP125A3 mediante espectroscopia	94
1.2.3. Ensayos de actividad monooxigenasa del CYP125A3	101
1.3. Caracterización biofísica y bioquímica del citocromo CYP142A2 de <i>M. smegmatis</i>	103
1.3.1. Clonación, expresión heteróloga y purificación de CYP142A2	103
1.3.2. Caracterización espectroscópica del citocromo CYP142A2	105
1.3.2.1. Propiedades espectroscópicas del citocromo CYP142A2	105
1.3.2.2. Estudios de unión a ligandos del CYP142A2 mediante espectroscopía	106
1.3.3. Ensayos de actividad monooxigenasa del CYP142A2	111
1.4. Implicación de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 en el metabolismo del colesterol en <i>M. smegmatis</i>	112
1.4.1. Estudios de crecimiento en colesterol y colesteno de los diferentes mutantes	113
1.4.2. Análisis de la producción de metabolitos intermediarios de la degradación de 4-colesten-3-ona en los diferentes mutantes.	117
1.4.3. Análisis de la expresión endógena de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2	119
1.4.3.1. Análisis de la expresión de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 mediante <i>Western blot</i>	119
1.4.3.2. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR	120
1.5. Análisis de las estructuras de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de <i>M. smegmatis</i> .	122
<b>2. Estudio de la regulación transcripcional del catabolismo del colesterol mediada por el regulador KstR</b>	129
2.1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína KstR de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	129
2.2. Hiperproducción y purificación de la proteína KstR	134
2.3. Estudio de las interacciones KstR-DNA	135
2.3.1. Estudios <i>in vitro</i> de la interacción de la proteína KstR con el promotor <i>P<sub>5228</sub></i>	135
2.3.2. Estudio <i>in vitro</i> del efecto represor del regulador KstR sobre la transcripción	137
2.3.2.1. Diseño y clonación del promotor artificial <i>P<sub>Q3</sub></i>	138
2.3.2.2. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor <i>P<sub>Q3</sub></i>	142
2.3.2.3. Análisis del efecto represor de KstR sobre la transcripción mediada por el promotor <i>P<sub>Q3</sub></i>	143
2.4. Identificación del inductor específico del represor KstR	145

## Índice

2.4.1. Identificación de posibles inductores mediante dicroísmo circular	146
2.4.2. Análisis de la interacción KstR-inductor mediante ultracentrifugación analítica	157
2.4.3. Análisis in vitro del efecto de los inductores sobre la interacción KstR-DNA	159
2.4.4. Análisis in vitro del efecto de los inductores sobre la transcripción mediada por el promotor	162
<i>P<sub>Q3</sub></i>	
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	165
<b>1. Análisis de los citocromos P450 implicados en la degradación de la cadena lateral del colesterol en <i>M. smegmatis</i> mc2 155</b>	167
<b>2. Evolución estructural de los citocromos P450 CYP125 y CYP142 en micobacterias</b>	174
<b>3. Análisis de la regulación transcripcional mediada por el regulador KstR</b>	177
<b>4. Implicación de las primeras etapas de la degradación del colesterol en el control transcripcional de la ruta</b>	186
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	191
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	195

## **I. SUMMARY**



## 1. INTRODUCTION

### **Cholesterol and other steroid compounds**

Cholesterol is a steroid commonly found in nature with a great relevance in biology, medicine and chemistry, playing an essential role as a structural component of animal cell membranes. Cholesterol is a recalcitrant molecule to biodegradation because of its low number of functional groups (one CC double bond and a single hydroxyl group), its low solubility in water ( $3 \times 10^{-8}$  M) and its complex spatial conformation constituted by four alicyclic rings and two quaternary carbon atoms. Steroids, some of them derived from cholesterol, constitute a new class of pollutants discharged into the environment as a result of human activity (Gagné *et al.*, 2006). The potent metabolic activities of these compounds affect a large number of cellular processes and thus, their presence and accumulation in water wastes and in certain ecological niches can affect the endocrine system of animals and humans. The ubiquity of cholesterol and related sterols in the environment has made them a common carbon source for many different microorganisms, some of them being important pathogens as *Mycobacterium tuberculosis* (Pandey and Sassetti, 2008; Chang *et al.*, 2009; Nesbitt *et al.*, 2010). On the other hand, the bacterial metabolism of steroids has attracted also considerable attention as low-cost natural steroids like cholesterol can be used as starting materials for many bioactive synthetic steroids (Fernandes *et al.*, 2003). Therefore, the characterization of the bacterial metabolism of cholesterol could be useful not only to understand its influence in pathological processes like tuberculosis, but also to develop new organisms by metabolic engineering with potential use as biotechnological tools.

### **Aerobic degradation of cholesterol**

Although the bacterial catabolism of cholesterol has not been fully elucidated in any of the bacterial strains degrading sterols, the metabolic pathway can be postulated by combining the biochemical and genetic studies carried out in different organisms. To

## Summary

facilitate the comprehension of the catabolic process it can be divided into four major steps as presented below.

### a) Transformation of cholesterol into cholest-4-en-3-one

It is generally assumed that the first reaction in the aerobic metabolism of cholesterol is its oxidation to cholest-4-en-3-one through two sequential reactions. That is the oxidation of cholesterol to cholest-5-en-3-one followed by its isomerization to cholest-4-en-3-one. The enzymes responsible of this activity are cholesterol oxidases, or 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerases (3- $\beta$ -HSD). In *M. smegmatis* these steps are catalysed by at least two different 3- $\beta$ -HSD encoded by the genes *MSMEG\_5228* and *MSMEG\_5233* (Uhía *et al.*, 2011b).

### b) Cholesterol side-chain degradation

Recent data demonstrate that two key enzymes, the P450 cytochromes CYP125 or CYP142 initiate cholesterol side-chain degradation in *M. tuberculosis* and *R. jostii* RHA1 (Capyk *et al.*, 2009; McLean *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010). These cytochromes belongs to the P450 family and catalyze sequential oxidations of cholesterol or cholest-4-en-3-one side-chains at the C26 position, forming first the alcohol (26-hydroxycholest-4-en-3-one), then the aldehyde (cholest-4-en-3-one-26-al) and finally the acid (cholest-4-en-3-one-26-oic). After the formation of the carboxylic acid intermediate, the cholesterol side-chain is shortened by a  $\beta$ -oxidation like process initiated by an ATP-dependent sterol/steroid CoA ligase catalyzing the CoA activation of the C26 carboxylic acid intermediate (Sih *et al.*, 1968a; Sih *et al.*, 1968b). Subsequent cleavage of the side-chain to 17-ketosteroid takes place stepwise in three consecutive cycles and two molecules of propionyl-CoA and one molecule of acetyl-CoA are formed. The combination of the two first enzymatic steps, *i.e.*, the oxidation of cholesterol together with the degradation of its side-chain, renders the central intermediate 4-androstene-3,17-dione (AD) that is further metabolized by the central catabolic pathway.

c) Central catabolic pathway

Once the aliphatic chain has been oxidized, cholesterol catabolism appears to follow the common pathway described for C19 steroids. Briefly, 3-ketosteroid-D1-dehydrogenases, KsdD or KstD, transform AD into androsta-1,4-diene-3,17-dione (ADD). Later on, a 9 $\alpha$ -hydroxylation takes place catalyzed by KshAB followed by a non-enzymatic transformation of the 9 $\alpha$ -hydroxyandrosta-1,4-diene-3,17-dione to 3-hydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5 (10)-trien-9,17-dione (3-HSA). Subsequently 3-HSA is hydroxylated by two-component oxygenase leading to the production of 3,4-dihydroxy-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-dione (3,4-DHSA). The last catechol derivative is cleaved by a meta extradiol dioxygenase, HsaC, yielding 4,5,9,10- diseco-3-hydroxy-5,9,17-trioxoandrosta-1(10),2-diene-4-oic acid (4,9-DSHA). This compound is then hydrolysed yielding 2-hydroxyhexa-2,4-dienoic and 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oic (DOHNAA) acids.

d) Lower catabolic pathway

The enzymes involved in this downward pathway have not been yet investigated in detail. Most likely the catabolism of the 2-hydroxyhexa-2,4- dienoic acid involves genes similar to the *tesE*, *tesF* and *tesG* testosterone catabolic genes from *C. testosteroni* and eventually will be transformed into propionic acid (Horinouchi *et al.*, 2005). DOHNAA would be further transformed to succinic acid by two steps, i.e. the activation of DOHNAA by ATP and CoA, followed by a reduction of DOHNAA-CoA by an NADPH-dependent dehydrogenase (Miclo and Germain, 1990).

**Regulation of the cholesterol catabolism**

Recently, it has been shown that cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional repressors (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010). KstR, is encoded by the *Rv3574* gene in *M. tuberculosis* and by the *MSMEG\_6042* gene in *M. smegmatis*. KstR controls the expression of 83 cholesterol catabolic genes (*kstR* regulon) (Kendall *et al.*, 2007) being many of these genes essential



## Summary

for virulence of *M. tuberculosis* (Sasseti and Rubin, 2003; Schnappinger *et al.*, 2003; Rengarajan *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). The operator motif of KstR is a 14 bp conserved sequence (TnnAACnnGTTnnA) located in the upstream region of the KstR regulated genes (Kendall *et al.*, 2007) (Uhía *et al.*, 2011a). KstR2 is encoded by *Rv3557c* and *MSMEG\_6009* genes in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, respectively, and controls the expression of 15 cholesterol catabolic genes (*kstR2* regulon) responsible for the lower pathway (Kendall *et al.*, 2010). The mechanisms involved in the KstR and KstR2 regulation are still poorly understood. Only the KstR-dependent promoter of the *MSMEG\_5228* gene of *M. smegmatis*, which encodes an HSD responsible for the first step in the cholesterol degradative pathway, has been characterized in more detail (Uhía *et al.*, 2011a).

## 2. OBJECTIVES

Very recently the catabolism of cholesterol has acquired a high relevance because it is involved in the pathogenic mechanisms of *M. tuberculosis* and due to the biotechnological applications of sterol transforming enzymes for the pharmaceutical industry. However some of the biochemical steps of the cholesterol degradation pathway and the mechanisms of transcriptional regulation have not been yet fully described. Taken these assumptions into account, the objectives proposed in this work were the following:

- Identification and characterization of the cytochromes P450 involved in the first steps of the cholesterol side-chain degradation in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155.
- New insight into the transcriptional regulation of cholesterol catabolism in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155: Identification of the KstR inducer.

## 3. RESULTS

**Identification and characterization of the cytochromes P450 involved in the first steps of the cholesterol side-chain degradation in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155.**

The *MSMEG\_5995* and *MSMEG\_5918* genes encode the CYP125A3 and CYP142A2 P450 cytochromes in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. These cytochromes show a high amino acid sequence identity with the cytochromes CYP125A1 and CYP142A1 from *M. tuberculosis*, respectively. The genomic regions containing these genes are highly conserved in both species.

The recombinant forms of CYP125A3 and CYP142A2 from *M. smegmatis* were heterologously produced in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  after cloning the corresponding coding genes in the pCWOri+ expression vector and the proteins were purified to electroforetical homogeneity. CYP125A3 displayed spectral properties typical for a ferric P450 with most of the heme-iron in a high spin (HS) state, whereas CYP142 has all its heme in the low spin state (LS).

Binding of steroid ligands and antifungal azole drugs to CYP125A3 and CYP142A2 was studied by measuring the changes in the optical absorption spectra of the cytochromes. The addition of cholesterol and cholest-4-en-3-one to CYP125A3 and CYP142A2 results in a complete conversion to the HS form because of the displacement of the water molecule coordinated to the heme iron atom (Type I spectral shift). On the other hand, several antifungal azoles (econazole, miconazole and clotrimazole) bind to CYP125A3 and CYP142A2, inducing a Type II spectral shift.

The enzymatic activities of the two *M. smegmatis* P450 cytochromes were examined *in vitro* using the heterologous electron donor partners, spinach ferredoxin and ferredoxin reductase, and an NADPH regenerating system. We observed the subsequent oxidations of cholest-3-en-4-one to 26-hydroxycholest-4-en-3-one, cholest-4-en-3-one-26-al and finally to cholest-4-en-3-one-26-oic acid (3OChA).

The roles of CYP125A3 and CYP142A2 in cholesterol catabolism were also investigated by mutagenesis of their respective coding genes. The duplication rates of

## Summary

the single mutant strains *Δcyp125* and *Δcyp142* were very similar to that the wild-type strain. However, the double mutant strain *Δcyp125-Δcyp142* shows a long lag phase and a higher duplication rate.

By qRT-PCR and Western Blot experiments we have demonstrated that CYP142A2 is induced at transcriptional and translational levels in the *Δcyp125* mutant strain compared with the wild type strain.

The crystal structure of both substrate-free CYP125A3 and CYP142A2, and of cholest-4-en-3-one-bound CYP142A2 reveal significant differences in the substrate binding sites compared with the homologous *M. tuberculosis* proteins.

### **New insight into the KstR transcriptional regulation of cholesterol catabolism in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155**

The KstR repressor from *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, encoded by the *MSMEG\_6042* gene was heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3) using the pET29a(+) vector. KstR was purified to electrophoretic homogeneity and biophysically characterized by circular dichroism (CD) and analytical ultracentrifugation.

Schnappinger et al. (2003) have shown by microarray assays that palmitic acid induced the expression of several genes of the *kstR* regulon in *M. tuberculosis*. To provide further insights into the repression mechanism mediated by KstR in *M. smegmatis*, the physical interactions of KstR with several fatty acids and their corresponding alcohols were measured by CD following the thermal denaturation of the protein. In the absence of ligands, KstR showed a thermal denaturation profile consistent with two states, folded and unfolded with a  $T_m$  of  $62.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . The addition of palmitic acid or oleic acid resulted in a decrease of KstR thermal stability, suggesting that molecules containing a long hydrophobic carbon-chain and a carboxylic moiety are able to induce conformational changes which reduce the thermal stability of KstR. The intermediates 5-cholestene-26-oic acid-3 $\beta$ -ol (3OHChA) and cholest-4-en-3-one-26-oic acid (3OChA) produced at the initial steps in the cholesterol catabolic pathway, show

some structural similarities with palmitic acid. These intermediates also induced a huge decrease on the  $T_m$  of KstR. However cholesterol, cholest-4-en-3-one, 27-hydroxycholesterol and the central intermediates AD and ADD did not induce any significant change in the thermal denaturation profile of KstR. In addition, palmitic acid, 3OChA and 3OHChA also cause a significant decrease of the  $\alpha$ -helical content of KstR.

The effect of these compounds on the interaction of  $P_{5228}$  promoter of *M. smegmatis* and the KstR repressor was tested by electro-mobility shift assay (EMSA). Any significant decrease of the affinity of KstR to DNA could be observed in the presence of palmitic acid or 3OHChA, whereas KstR was clearly released from DNA in the presence of 3OChA at very low concentrations, suggesting that only 3OChA is able to induce the precise conformational change required to release the DNA-KstR interaction.

*In vitro* transcription experiments have been performed to study the functionality of KstR as a transcriptional repressor and also to analyze the induction effect of 3OChA, 3OHChA and palmitic acid on the KstR-regulated promoters. As  $P_{5228}$  promoter is hardly recognized *in vitro* by the *E. coli* RNA polymerase, we had to design a chimeric synthetic promoter  $P_{Q3}$  containing the -35 and -10 boxes of the *lacUV5* promoter from *E. coli* and the consensus KstR operator sequence from *M. smegmatis*. This promoter is able to initiate *in vitro* transcription using the *E. coli* RNA polymerase. When KstR was added to the reaction mixture the  $P_{Q3}$  activity was clearly repressed. The addition of increasing concentrations of 3OChA restored the transcription level from the  $P_{Q3}$  promoter. However, the addition of palmitic acid and 3OHChA, even at high concentrations, did not cause such de-repression effect.

#### 4. DISCUSSION

## Summary

The results presented in this work provide new information about the initial steps of cholesterol catabolic pathway in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Cytochromes CYP125A3 and CYP142A2 in this strain catalyze the sequential oxidations at C26, to form alcohol, aldehyde and finally acid metabolites, ultimately producing the 5-cholestene-26-oic acid-3 $\beta$ -ol (3OHChA) and 4-cholesten-3-one-26-oic acid (3OChA) as it has been previously described for CYP125A1 and CYP142A1 from *M. tuberculosis* (Johnston *et al.*, 2010). However, CYP142A2 appears to be about twice as catalytically active as CYP125A3 towards cholest-4-en-3-one, mirroring the observed activity difference in the *M. tuberculosis* orthologs (Johnston *et al.*, 2010).

CYP125A3 and CYP142A2 from *M. smegmatis* show >75% identity with their respective *M. tuberculosis* orthologs and the recombinant expressed proteins present similar spectroscopic properties to their counterparts in *M. tuberculosis*. CYP125A3 and CYP142A2 each bind cholesterol and 4-cholesten-3-one, thus inducing a type I spin shift, however, CYP142A2 shows weaker affinity for its substrates than CYP142A1.

The analyses of the implication of these cytochromes in the different mutant strains suggest that, although CYP125A3 is the main enzyme responsible for the transformation of cholesterol and cholest-4-on-3-one into their oxidized metabolites, CYP142A2 supports the growth in absence of CYP125A3. The capacity of the double mutant  $\Delta cyp125\Delta cyp142$  to grow using both steroids as carbon and energy sources suggests that other P450 cytochromes encoded in the *M. smegmatis* are also able to perform the C26 oxidation.

Unlike the CYP125A3 whose crystal structures reveal an active site entirely enclosed within the protein structure, the carbonyl group of cholest-4-en-3-one in CYP142A2 is exposed to the bulk solvent. Based on the different topology of the active sites, we speculate that the compensatory roles attributed to CYP142 may be a byproduct of its distinct physiologic function of targeting a pool of sterol derivatives inaccessible to CYP125. We hypothesize that cholesteryl esters might be potential substrates for CYP142. Compared to the *M. tuberculosis* counterparts, both CYP125A3

and CYP142A2 of *M. smegmatis* each contain three amino acid substitutions in direct proximity to the substrate in the active site. Hypothetically, these differences could have been driven by diversification of the active sites of CYP125 and CYP142 orthologs in pathogenic and environmental mycobacteria. *M. tuberculosis* infecting human cells would have no access to natural steroids different from cholesterol, whereas *M. smegmatis* would find in the soil phytosterols and many other esters of steroids that could be used as substrates. For this reason the CYPs of *M. smegmatis* might be more flexible and accept a larger variety of substrates than the orthologous CYPs of *M. tuberculosis*.

The results presented in this Thesis demonstrate for the first time that the compound 4-cholesten-3-one-26-oic acid (3OChA), an intermediate of cholesterol metabolism in *M. smegmatis* works as a true inducer of the KstR repressor triggering the expression of genes belonging to the *kstR* regulon.

The peculiar and specific bimodal thermal denaturation curve of KstR observed by CD in the presence of 3OChA suggests that this compound causes the specific conformational change in the DNA-binding domain of KstR required for releasing the KstR-DNA complex and relax the repression. Such structural destabilization of KstR can be most likely ascribed to the decrease of the  $\alpha$ -helix content, which is more evident after its interaction with 3OChA than with palmitic acid or 3OHChA.

The EMSA experiments demonstrated that 3OChA was the only compound able to release the binding of KstR to the DNA probe at low concentrations, whereas palmitic acid required higher concentrations to release KstR and 3OHChA did not cause any effect. The combination of the results obtained by CD, EMSA and *in vitro* transcription experiments strongly suggests that 3OChA is the true inducer of the *kstR* regulon.

Summarizing, the results presented in this work provide new insights into the first steps of cholesterol metabolism in *M. smegmatis* and highlight the importance of these reactions in the transcriptional regulation of this catabolic pathway. The identification of the inducer molecule responsible for activation of KstR-

## Summary

regulated genes involved in cholesterol degradation in mycobacteria is of critical importance because it could represent the first step in the way of developing new strategies to combat infections caused by the pathogen *M. tuberculosis*.

## 5. CONCLUSIONS

- The cytochromes CYP125A3 and CYP142A2 from *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 catalyze the sequential oxidations of cholesterol and cholest-4-en-3-one at C26, to form alcohol, aldehyde and finally acid metabolites, ultimately producing the 5-cholestene-26-oic acid-3 $\beta$ -ol (3OHChA) and 4-cholesten-3-one-26-oic acid (3OChA).
- CYP125A3 is the main enzyme responsible for the transformation of cholesterol and cholest-4-on-3-one into their oxidized metabolites in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 and CYP142A2 supports its activity in absence of CYP125A3.
- Other P450 cytochromes are able to perform the biochemical step catalyzed by CYP125A3 and CYP142A2, indicating the high redundancy of these enzymes in *M. smegmatis*.
- 3OChA resulted of the reaction carry out by cytochromes CYP125A3 and CYP142A2 on cholestenone is the true inducer of the KstR repressor, activating the transcription of the KstR-regulated genes involved in the upper and central catabolic pathway.

## 6. REFERENCES

Capyk, J. K., Kalscheuer, R., Stewart, G. R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., Okamoto, S., Jacobs, W. R., Eltis, L. D. and Mohn, W. W. (2009). Mycobacterial Cytochrome P450 125 (Cyp125) Catalyzes the Terminal Hydroxylation of C27 Steroids. *Journal of Biological Chemistry* **284**(51), 35534-35542.

**Chang, J. C., Harik, N. S., Liao, R. P. and Sherman, D. R. (2007).** Identification of Mycobacterial Genes That Alter Growth and Pathology in Macrophages and in Mice. *Journal of Infectious Diseases* **196**(5), 788-795.

**Chang, J. C., Miner, M. D., Pandey, A. K., Gill, W. P., Harik, N. S., Sassetti, C. M. and Sherman, D. R. (2009).** *igr* Genes and Mycobacterium tuberculosis Cholesterol Metabolism. *Journal of Bacteriology* **191**(16), 5232-5239.

**Driscoll, M. D., McLean, K. J., Levy, C., Mast, N., Pikuleva, I. A., Lafite, P., Rigby, S. E. J., Leys, D. and Munro, A. W. (2010).** Structural and Biochemical Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142: Evidence for multiple cholesterol 27-hydroxylase activities in a human pathogen. *Journal of Biological Chemistry* **285**(49), 38270-38282.

**Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. and Cabral, J. M. S. (2003).** Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology* **32**(6), 688-705.

**Gagné, F., Blaise, C. and André, C. (2006).** Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**(3), 329-336.

**Horinouchi, M., Hayashi, T., Koshino, H., Kurita, T. and Kudo, T. (2005).** Identification of 9,17-Dioxo-1,2,3,4,10,19-Hexanorandrostane-5-oic Acid, 4-Hydroxy-2-Oxohexanoic Acid, and 2-Hydroxyhexa-2,4-Dienoic Acid and Related Enzymes Involved in Testosterone Degradation in *Comamonas testosteroni* TA441. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(9), 5275-5281.

**Johnston, J. B., Ouellet, H. and de Montellano, P. R. O. (2010).** Functional Redundancy of Steroid C26-monooxygenase Activity in *Mycobacterium tuberculosis* Revealed by Biochemical and Genetic Analyses. *Journal of Biological Chemistry* **285**(47), 36352-36360.

**Kendall, S. L., Burgess, P., Balhana, R., Withers, M., ten Bokum, A., Lott, J. S., Gao, C., Uhia-Castro, I. and Stoker, N. G. (2010).** Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: *kstR* and *kstR2*. *Microbiology* **156**(5), 1362-1371.

**Kendall, S. L., Withers, M., Soffair, C. N., Moreland, N. J., Gurucha, S., Sidders, B., Frita, R., Ten Bokum, A., Besra, G. S., Lott, J. S. and Stoker, N. G. (2007).** A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **65**(3), 684-699.

**McLean, K. J., Lafite, P., Levy, C., Cheesman, M. R., Mast, N., Pikuleva, I. A., Leys, D. and Munro, A. W. (2009).** The Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: MOLECULAR BASIS FOR CHOLESTEROL BINDING IN A P450 NEEDED FOR HOST INFECTION. *Journal of Biological Chemistry* **284**(51), 35524-35533.

**Miclo, A. and Germain, P. (1990).** Catabolism of methylperhydroindanedione propionate by *Rhodococcus equi*: evidence of a MEHIP-reductase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**(5), 594-599.



## Summary

**Nesbitt, N. M., Yang, X., Fontán, P., Kolesnikova, I., Smith, I., Sampson, N. S. and Dubnau, E. (2010).** A Thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* Is Required for Virulence and Production of Androstenedione and Androstadienedione from Cholesterol. *Infection and Immunity* **78**(1), 275-282.

**Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J. B., Chow, E. D., Kells, P. M., Burlingame, A. L., Cox, J. S., Podust, L. M. and De Montellano, P. R. O. (2010).** *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Molecular Microbiology* **77**(3), 730-742.

**Pandey, A. K. and Sassetti, C. M. (2008).** Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(11), 4376-4380.

**Rengarajan, J., Bloom, B. R. and Rubin, E. J. (2005).** Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23), 8327-8332.

**Rosłonec, K. Z., Wilbrink, M. H., Capyk, J. K., Mohn, W. W., Ostendorf, M., Van Der Geize, R., Dijkhuizen, L. and Eltis, L. D. (2009).** Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Molecular Microbiology* **74**(5), 1031-1043.

**Sassetti, C. M. and Rubin, E. J. (2003).** Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(22), 12989-12994.

**Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C. and Schoolnik, G. K. (2003).** Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *The Journal of Experimental Medicine* **198**(5), 693-704.

**Sih, C. J., Tai, H.-H., Tsong, Y. Y., Lee, S. S. and Coombe, R. G. (1968a).** Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry* **7**(2), 808-818.

**Sih, C. J., Wang, K.-C. and Tai, H.-H. (1968b).** Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIII. C22 acid intermediates in the degradation of the cholesterol side chain. *Biochemistry* **7**(2), 796-807.

**Uhía, I., Galán, B., Medrano, F. J. and García, J. L. (2011a).** Characterization of the KstR-dependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **157**(9), 2670-2680.

**Uhía, I., Galán, B., Morales, V. and García, J. L. (2011b).** Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Environmental Microbiology* **13**(4), 943-959.

## **II.INTRODUCCIÓN**



## 1. El colesterol y los compuestos esteroideos

---

### 1.1. Los esteroides y esteroides

Los esteroides son compuestos orgánicos de gran interés biológico, medioambiental e industrial que se encuentran ampliamente distribuidos en la Naturaleza. Su estructura contiene un esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno que se caracteriza por presentar una estructura policíclica formada por 3 ciclohexanos (anillos A, B y C) y un ciclopentano (anillo D) (Fig. 1 A). Este núcleo esteroideo es prácticamente plano y relativamente rígido de tal manera que los anillos fusionados no permiten la rotación en los enlaces C-C. Los derivados de esta estructura básica, constituida por 17 carbonos presentan multitud de modificaciones estructurales, lo cual origina una gran variabilidad de esteroides. Las modificaciones más importantes consisten en la diferente saturación de los anillos, la presencia de grupos metilo en las posiciones C-10 y C-13, la presencia de un grupo hidroxilo o carbonilo en C3 y la presencia de una cadena alifática en la posición C-17 (JCBN, 1989). La longitud de dicha cadena lateral, así como la presencia de diferentes grupos funcionales (en configuración  $\alpha$  o  $\beta$ ), determinan las características biológicas, químicas y fisiológicas propias de cada esteroide.

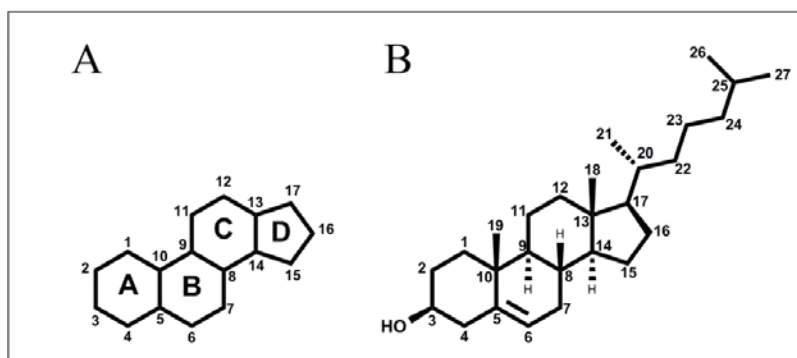


Figura 1. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno (A) y del colesterol (B).

## Introducción

Los esteroides son compuestos esteroideos que poseen un grupo hidroxilo en la posición C-3 y que conservan la mayor parte del esqueleto del colestano, formado por el núcleo esteroideo y una cadena lateral de 8 átomos de carbono en posición C-17 (Fig. 1 B). Entre los esteroides de origen natural destacan los fitosteroides en plantas ( $\beta$ -sitosterol, el campesterol y el estigmasterol), el ergosterol en hongos y levaduras, que puede ser usado como indicador de contaminación fúngica (Parsi and Górecki, 2006), y el colesterol en células animales. En organismos eucariotas, los esteroides son constituyentes fundamentales de las membranas celulares, a las cuales confieren estabilidad e impermeabilidad (Nelson *et al.*, 2008). Además son precursores de una gran variedad de productos con actividades biológicas específicas que afectan a un gran número de procesos celulares, algunos de ellos tan esenciales como la proliferación celular, control de ciclo celular y mecanismos básicos de reconocimiento intercelular, entre otros (Majewska, 2007). En lo referente a los organismos procariotas, se han descrito muy pocos casos en los que se encuentren evidencias de la síntesis de esteroides, como por ejemplo en algunas micobacterias (Lamb *et al.*, 1998), aunque la funcionalidad de estos esteroides sintetizados en bacterias todavía no se conoce. Sin embargo, los esteroides pueden ser degradados por algunas bacterias capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía para su crecimiento (ver apartado 2 de esta sección).

El colesterol (3-hidroxi-5,6-colesteno) (Fig. 1 B) es un esteroide de 27 átomos de carbono en el que el grupo hidroxilo del C3 adopta una configuración. Este alcohol policíclico es una de las moléculas más comunes en la naturaleza, donde se encuentra formando parte de las membranas celulares de las células animales (Slaytor and Bloch, 1965).

Aunque es una molécula esencial para muchos animales, incluido el ser humano, los mamíferos no requieren el colesterol en la dieta, ya que todas las células pueden sintetizarlo a partir de precursores simples. Dado que la cantidad total de colesterol (absorbido más sintetizado) sobrepasa la cantidad requerida por el organismo para atender al normal funcionamiento celular, parte de ese colesterol debe

ser eliminado. Debido a que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para degradar el núcleo del colesterol, este se excreta tal cual, con pequeñas modificaciones estructurales o bien transformado en otros compuestos esteroideos (ácidos biliares u hormonas esteroideas)(Björkhem and Eggertsen, 2001).

El colesterol tiene una gran importancia metabólica, ya que es el precursor inmediato de un gran número de sustancias tales como vitaminas, hormonas esteroideas y ácidos biliares (Miller, 1988; Björkhem and Eggertsen, 2001). Todas las hormonas esteroideas derivan del colesterol. En la corteza de la glándula adrenal se sintetizan dos clases de hormonas esteroideas: los mineralocorticoides, que controlan la reabsorción de iones inorgánicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , y  $\text{HCO}_3^-$ ) por el riñón, y los glucocorticoides, que afectan al metabolismo de proteínas y carbohidratos (participan en la regulación de la gluconeogénesis, por ejemplo), reducen la respuesta inmune, la inflamación y las respuestas alérgicas. Las hormonas sexuales se producen en las gónadas masculinas y femeninas y en la placenta. Entre ellas se encuentran la progesterona, que regula el ciclo reproductivo femenino, y los andrógenos (como la testosterona) y estrógenos (como el estradiol), que influyen en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios masculinos y femeninos, respectivamente. Los ácidos y sales biliares son derivados hidrofílicos del colesterol que tienen un papel importante en la digestión, donde participan en la emulsión de las grasas de la dieta. Por último, la vitamina D también deriva de la molécula de colesterol. La vitamina D<sub>3</sub>, también llamada colecalciferol, se forma normalmente en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol en una reacción fotoquímica catalizada por el componente ultravioleta de la luz solar. Posteriormente es convertida por enzimas en el hígado y los riñones a 1,25-dihidroxicolecalciferol, la hormona activa, que regula la absorción de calcio en el intestino y los niveles de calcio en riñones y hueso (Nelson y Cox, 2004).

### 1.2. Importancia de los esteroides como contaminantes ambientales

En los últimos años, como consecuencia de la actividad humana incontrolada, se ha producido el vertido de numerosos compuestos contaminantes al medio ambiente. La contaminación procede en parte como resultado de diversas actividades industriales, pero también de los efluentes municipales, que son hoy en día una de las mayores fuentes de emisión de estos residuos. Estos vertidos no sólo aportan hidrocarburos, pesticidas, surfactantes y distintos metales, sino que también aportan esteroides y esteroides de origen natural y sintético. La presencia y/o acumulación en determinados nichos ecológicos de estas moléculas de naturaleza esteroídica o derivados directos de éstas puede causar efectos muy perjudiciales sobre la salud humana y alterar los ciclos biológicos de algunas especies animales o vegetales que forman parte de estos ecosistemas.

Dentro de los compuestos esteroídicos, el colesterol y especialmente algunos de sus derivados se consideran hoy en día importantes contaminantes medioambientales. Muchos de los compuestos esteroídicos se encuentran entre los productos farmacéuticos y los denominados productos para el cuidado personal (PPCPs) que han sido clasificados como una clase emergente de contaminantes de especial relevancia para los medios acuáticos (Gagné *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2011). Entre los productos de origen farmacéutico se encuentra el anticonceptivo sintético oral 17 $\alpha$ -etinilestradiol, considerado responsable, junto con los estrógenos 17 - estradiol y estrona, de causar la producción de vitelogenina (feminización) en peces macho (Daughton y Ternes, 1999). Este fenómeno de feminización fue observado por primera vez en lagunas de tratamiento de aguas residuales a mediados de los años 80 (Routledge *et al.*, 1998). Además, hay que señalar que el colesterol es el principal componente de la lanolina, y este y otros esteroides relacionados son contaminantes naturales bastante resistentes al tratamiento anaeróbico que se lleva a cabo sobre los efluentes procedentes del lavado industrial de la lana (Poole y Cord-Ruwisch, 2004). Estos efluentes derivados del lavado de la lana están expresamente reconocidos como

altamente contaminantes por la legislación europea que regula el impacto ambiental de los residuos industriales (Directiva 85/377/CEE).

La cantidad de estrógenos procedentes de fuentes animales es de menor importancia que la procedente de aguas residuales, pero los residuos de estiércol contribuyen de manera importante a su entrada en el medio ambiente (Hanselman *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2004). El estiércol procedente de ganado y aves de corral también es considerado una fuente de testosterona ambiental (Lee *et al.*, 2003).

### 1.3. Interés industrial y biotecnológico de los esteroides

Muchos de los derivados del colesterol o de los compuestos con él relacionados poseen un gran valor como intermediarios en la síntesis de esteroides y esteroides de interés farmacológico, tales como antiinflamatorios, diuréticos, anticonceptivos, inmunosupresores, entre otros. Por ello, la industria químico-farmacéutica les ha prestado gran atención durante las últimas décadas (Demain, 1992; Sedlacek y Smith, 1988).

La compleja estructura de los esteroides hace que para su síntesis química se requieran procesos muy complejos en los que intervienen múltiples pasos de reacción. Además la quiralidad de la estructura de muchos de estos compuestos añade complejidad al diseño del proceso. Frente a estos inconvenientes, las biotransformaciones microbianas de los esteroides proporcionan una alternativa eficaz a la síntesis química, permitiendo la obtención de compuestos regio- y estereoselectivos. Desde que en 1952 se consiguió llevar a cabo la 11 $\alpha$ -hidroxilación de la progesterona empleando diferentes especies del género *Rhizopus* (Hogg, 1992), el uso de las biotransformaciones microbianas en los procesos de producción de medicamentos esteroideos y hormonas se han multiplicado (Mahato and Garai, 1997). Aunque algunas de estas biotransformaciones están bien definidas, la mejora en el rendimiento de éstas y la identificación de nuevas reacciones que puedan ser



## Introducción

potencialmente útiles son dos de los objetivos actuales de la industria de esteroides (Fernandes *et al.*, 2003). El conocimiento de las bases genéticas y bioquímicas de las rutas catabólicas de esteroides y de sus mecanismos de regulación en bacterias puede aportar a la industria farmacéutica enzimas con nuevas propiedades susceptibles de ser producidas, modificadas y mejoradas mediante técnicas de ingeniería de proteínas.

Muchos de los procesos de producción de esteroides parten de 4-androsten-3,17-diona (AD), 1,4-androsten-3,17-diona (ADD), 9-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (9OH-AD), 11-hidroxi-4-androsten-3,17-diona (11OH-AD) y 11-hidroxi-1,4-androsten-3,17-diona (11OH-ADD) como materias primas, por lo que estos cinco compuestos son en realidad considerados como sintonas de partida para la industria farmacéutica, por lo que los procesos de producción de estos compuestos constituye actualmente uno de los principales objetivos de la industria de esteroides.

Los esteroides que más se producen mediante biotransformación en la actualidad son el cortisol (*Curvularia lunata*), la prednisolona (*Arthrobacter simplex*), 11 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (*Rhizopus nigricans*), androstadiendiona (*Mycobacterium* sp.) y 1-deshidrotestololactona (*Cylindrocarpon radicícola*).

Las materias primas empleadas para estas biotransformaciones son muy variadas. Los fitoesteroles, entre los que se encuentran el estigmasterol, el  $\beta$ -sitosterol y el campesterol, son una de las materias primas más empleadas. Los fitoesteroles se extraen habitualmente de la soja pero también se pueden obtener del pino o de los residuos de la industria papelera (Fernandes *et al.*, 2003; Malaviya and Gomes, 2008). El colesterol, es otro de los materiales de partida más empleados, y se obtiene a partir de las grasas y aceites animales, como la manteca de cerdo, el sebo vacuno, la grasa de la leche o el aceite de pescado.

Además del interés para la industria farmacéutica, el estudio de los microorganismos capaces de degradar o transformar colesterol y otros esteroides ha permitido el desarrollo de biosensores de colesterol, de gran utilidad en el diagnóstico clínico (Arya *et al.*, 2008; Jubete *et al.*, 2009) y en la industria alimentaria (Jubete *et al.*,

2009), y ha permitido descubrir la capacidad de algunas bacterias probióticas de reducir los niveles de colesterol en sangre (Ooi and Liong, 2010). Algunas de las especies estudiadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium* (Pereira and Gibson, 2002). Los mecanismos por los cuales estas bacterias reducen los niveles de colesterol son varios, y no implica necesariamente la transformación del colesterol. Los mecanismos más habituales consisten en la transformación del colesterol a coprostanol (Harder y Probian, 1997) y la desconjugación enzimática de los ácidos biliares mediante hidrolasas (Begley *et al.*, 2006). En ambos casos los productos generados no son absorbidos en el intestino y son excretados directamente en las heces. Otros mecanismos consisten en la adhesión del colesterol a la superficie de las bacterias (Usman and Hosono, 1999), la incorporación de éste a las membranas durante el crecimiento y la co-precipitación del colesterol con los ácidos biliares desconjugados (Liong and Shah, 2005).

Por último, la caracterización de las rutas de degradación de esteroides permitiría el empleo de procedimientos de ingeniería metabólica para la modificación, el control y la ampliación de las capacidades degradativas de diversas cepas bacterianas, con el fin de su utilización como agentes biológicos descontaminantes y así paliar los problemas causados por la acumulación de esteroides.

## **2. Degradación bacteriana de compuestos esteroideos**

---

El colesterol y sus derivados son relativamente resistentes a la degradación microbiana. La condición recalcitrante de la molécula de colesterol es atribuida al bajo número de grupos funcionales (un único doble enlace C-C y un sólo grupo hidroxilo), a su baja solubilidad en agua ( $3 \times 10^{-8}$  M) y a la complejidad de su conformación espacial. Por su alto índice de persistencia, el colesterol y algunos de sus derivados primarios, como el coprostanol, son ubicuos y se utilizan como biomarcadores de referencia en algunos análisis de contaminación medioambiental (Veiga *et al.*, 2005).

## Introducción

Dada la importancia del colesterol como contaminante medioambiental y el interés que ha suscitado tanto éste como alguno de sus derivados en la industria farmacéutica, la búsqueda de microorganismos capaces de degradar colesterol ha adquirido una gran relevancia en el último siglo. En el año 1913 se describieron por primera vez algunas especies del género *Mycobacterium* que podían utilizar el colesterol como única fuente de carbono y energía (Söhngen, 1913). Años más tarde se comprobó que microorganismos pertenecientes al género *Proactinomyces* eran capaces de degradar parcialmente el colesterol añadido al medio de cultivo y que algunos de ellos, en particular *P. erythropolis*, posteriormente renombrado como *Rhodococcus erythropolis*, acumulaba ciertos compuestos estructuralmente relacionados con el colesterol, lo que ponía de manifiesto su capacidad para transformar esta molécula y su uso potencial para obtener nuevos derivados esteroídicos (Turfitt, 1944; Turfitt, 1948). Además se comprobó que ciertas especies de *Azotobacter* podían transformar el colesterol en 4-colesten-3-ona o en 7-deshidrocolesterol y que muchas de ellas hidrolizaban la cadena lateral generando metilheptanona que se acumulaba en el medio de cultivo (Horvath y Kramli, 1947). Whitmarsh demostró que ciertas especies de *Nocardia* aisladas del suelo eran capaces de hidrolizar la cadena lateral del colesterol transformando esta molécula en diferentes derivados esteroídicos, muchos de los cuales tenían características parecidas a ciertas hormonas sexuales (Whitmarsh, 1964). Otros autores pusieron de manifiesto que distintas bacterias pertenecientes a los géneros *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Serratia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* o *Protaminobacter*, entre otras, eran capaces de degradar total o parcialmente el colesterol y otros esteroides (Arima et al., 1969; Brown y Peterson, 1966; Chipley et al., 1975; Ferreira y Tracey, 1984; Martin, 1977; Nagasawa et al., 1969; Tak, 1942), si bien hay que decir que muchas de estas cepas hoy en día se clasifican de diferente manera.

## 2.1. Degradación aeróbica de esteroides

En la actualidad, el catabolismo aeróbico de esteroides en bacterias Gram-negativas se ha estudiado en profundidad en *Comamonas testosteroni* TA441 (anteriormente denominada *Pseudomonas testosteroni*), una cepa que además de testosterona es capaz de utilizar también los ácidos biliares como fuente de carbono y energía, pero no el colesterol. Se ha estudiado exhaustivamente la ruta de degradación de la testosterona en esta bacteria, y muchas de las etapas de la misma se han caracterizado a nivel genético y bioquímico (Horinouchi et al., 2001; Horinouchi et al., 2003a; Horinouchi et al., 2003b; Horinouchi et al., 2004a; Horinouchi et al., 2004b; Horinouchi et al., 2005). Así, la mayoría de los genes de la ruta de degradación de la testosterona, denominados genes *tes*, ya han sido caracterizados, si bien aún existen algunas lagunas de conocimiento sobre su funcionalidad. En esta bacteria se han caracterizado muy bien algunas enzimas (así como sus respectivos genes) que intervienen en la metabolización de esteroides. Entre ellas cabe destacar la 3 - hidroxisteroide deshidrogenasa/carbonilreductasa (3 $\alpha$ -HSD/CR codificada por el gen *hsdA*), que cataliza la oxidorreducción en posición 3 de una gran variedad de esteroides C19-27 (Hwang et al., 2005); la 3-oxo- $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -esteroide isomerasa (KSI), que transforma la 5-androsten-3,17-diona en 4-androsten-3,17-diona (4-AD) (Kuliopulos et al., 1987); y las  $\Delta^4$ -deshidrogenasas ( $\Delta^4$ -DHs, 3-oxo- $\Delta^4(5\alpha)$ -esteroide y 3-oxo- $\Delta^4(5\beta)$ -esteroide deshidrogenasas), que catalizan la conversión del 1-androstene-3,17-diona (AD) (anillos A:B trans o cis, respectivamente) en ADD (Florin et al., 1996).

## 2.2. Degradación aeróbica del colesterol

Aunque el catabolismo bacteriano del colesterol no se ha dilucidado completamente en ninguna de las bacterias capaces de metabolizarlo, y por lo tanto no se conoce su ruta de degradación completa, a partir de la combinación de diferentes estudios bioquímicos realizados con varias cepas degradadoras de esteroides (Kieslich, 1985; Martin, 1977; Owen et al., 1983; Schoemer y Martin, 1980; Sedlacek y Smith,

## Introducción

1988; Szentirmai, 1990). A continuación se detallarán las diferentes etapas de esta ruta en tres apartados:

a) Transformación del colesterol en 4-colesten-3-ona. En esta ruta aeróbica parece que el primer paso es la oxidación de colesterol a 4-colesten-3-ona a través de dos reacciones secuenciales: la oxidación de colesterol a 5-colesten-3-ona seguida de su isomerización a 4-colesten-3-ona. La enzima que aporta esta primera actividad en el sistema degradativo es en algunos microorganismos una colesterol oxidasa, mientras que en otros se trata de una 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3- $\beta$ -HSD). En ambos casos se trata de enzimas bifuncionales que incluyen actividad 3- $\beta$ -hidroxiesteroide oxidasa o deshidrogenasa y actividad  $\Delta^5$ -3-cetoesteroide isomerasa.

b) Oxidación de la cadena lateral del colesterol. De forma simultánea o posteriormente a la oxidación del colesterol a colesteno tiene lugar la oxidación de la cadena alifática del colesterol. Las primeras etapas de este proceso han sido estudiadas en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1, y consisten en tres oxidaciones secuenciales del C26 realizadas por los citocromos P450 CYP125 y CYP142 (Capyk *et al.*, 2009; McLean *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010a). La primera oxidación conlleva la formación del derivado 26-hidroxi-4-colesten-3-ona, que presenta un grupo hidroxilo en el C-26. Las oxidaciones sucesivas dan lugar a la producción del ácido 4-colesten-3-ona-26-oico pasando previamente por el derivado aldehído. Después de la formación del derivado ácido, la cadena lateral es metabolizada mediante un proceso similar al de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, aunque la mayoría de las enzimas implicadas en el mismo no han sido identificadas hasta la fecha. El primer lugar se produce la activación del ácido carboxílico del C-27 gracias a la incorporación de una molécula de CoA, catalizado por una CoA ligasa (Sih *et al.*, 1968a; Sih *et al.*, 1968b). A continuación tendrían lugar tres ciclos consecutivos de  $\beta$ -oxidación. Los dos primeros constituirían ciclos típicos en los que intervendrían una acil-CoA deshidrogenasa, una enoil-CoA hidratasa, una hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y una tiolasa. Como resultado de estos dos primeros ciclos se liberaría propionil-CoA y acetil-CoA. En el último ciclo de  $\beta$ -oxidación no podría tener lugar el tercer paso de

deshidrogenación debido a la presencia del anillo D, por lo que es necesaria la actuación de una hidroxiaxil-CoA liasa que permitiría la liberación de propionil-CoA y de 4-androsten-3,17-diona (AD), considerado como uno de los metabolitos centrales en la degradación de esteroides (García *et al.*, 2012). Un gran número de genes inducidos en colesterol y relacionados con  $\beta$ -oxidación han sido recientemente identificados en *M. tuberculosis* (Griffin *et al.*, 2011) y *M. smegmatis* (Uhía *et al.*, 2012) pero hasta el momento sólo se conoce la implicación de algunas de ellos en la degradación de la cadena lateral. Muy recientemente se ha identificado en *R. rhodochrous* DSM43269 la enzima FadD19 como un esteroide-CoA ligasa esencial para la degradación de esteroides con cadena lateral de 5 átomos de carbono (C-24), lo que la relacionaría con el segundo ciclo de  $\beta$ -oxidación (Wilbrink *et al.*, 2011). Por otro lado, las enzimas ChsE1 y ChsE2, codificadas en el operón *igr* y denominadas inicialmente como FadE28 y FadE29 (Thomas *et al.*, 2011) constituyen dos acil-CoA deshidrogenasas que intervienen en el último ciclo de  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral (Thomas and Sampson, 2013). Finalmente, la enzima FadA5 de *M. tuberculosis* ha sido propuesta como una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa implicada en las reacciones de tiólisis de los dos primeros ciclos de  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral y se ha descrito como imprescindible para la formación de AD y ADD (Nesbitt *et al.*, 2010).

c) Rutas central y baja de degradación del colesterol. Una vez que la cadena alifática se ha oxidado, el metabolismo del colesterol parece seguir para la mayoría de bacterias aeróbicas una ruta catabólica común para esteroides de 19 átomos de carbono. Brevemente, 3-cetoesteroide- $\Delta^1$ -deshidrogenasas de baja especificidad, como KsdD en *M. smegmatis* (Brzostek *et al.*, 2005), KstD en *Rhodococcus erythropolis* (van der Geize *et al.*, 2000; van der Geize *et al.*, 2001; van der Geize *et al.*, 2002a) o TesH en *Comamonas testosteroni* (Horinouchi *et al.*, 2003b) transforman el compuesto 4-androstadien-3,17-diona (AD) en 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), que puede considerarse el metabolito central de las distintas etapas degradativas, así como metabolito central de la degradación de distintos esteroides, como la testosterona. Posteriormente tiene lugar una  $9\alpha$ -hidroxilación catalizada por KstH en *M. smegmatis*

(Andor et al., 2006) y KshAB en *R. erythropolis* (van der Geize et al., 2001; van der Geize et al., 2002b; van der Geize et al., 2008) y en *M. tuberculosis* (Capyk et al., 2009a), seguida de la transformación no enzimática de la 9 $\alpha$ -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona en 3-hidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3-HSA). La hidroxilación subsecuente de 3-HSA por enzimas como la oxigenasa de dos componentes TesA1A2 en *C. testosteronei* (Horinouchi et al., 2004a) conduce a la obtención de la 3,4-dihidroxi-9,10-secoandrosta-1,3,5(10)-trien-9,17-diona (3,4-DHSA), un derivado catecólico cuyo anillo A se abre por una extradiol dioxygenasa de tipo meta (TesB en *C. testosteronei* (Horinouchi et al., 2001); HsaC en *R. jostii* RHA1 (van der Geize et al., 2007) y en *M. tuberculosis* (Yam et al., 2009)) originando el ácido 4,5,9,10-diseco-3-hidroxi-5,9,17-trioxoandrosta-1(10), 2-dien-4-oico (4,9-DSHA). Este compuesto es hidrolizado por TesD en *C. testosteronei* (Horinouchi et al., 2003a), y HsaD en *M. tuberculosis* (Lack et al., 2008; Lack et al., 2009) o *R. jostii* RHA1 (van der Geize et al., 2007) originando los ácidos 2-hidroxi-2,4-hexadienoico y 9,17-dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oico (DOHNAA). Los siguientes pasos, en los que muy probablemente participan los genes catabólicos tesE, tesF, y tesG en *C. testosteronei* (Horinouchi et al., 2005) conducirían a metabolitos que entrarían ya en rutas generales de degradación (Kieslich, 1985). Sin embargo, las enzimas que intervienen en esta ruta baja están aún por confirmar. Parece que el ácido 2-hidroxi-2,4-hexadienoico se metaboliza a ácido 4-hidroxi-2-oxo-hexanoico (este paso estaría catalizado por TesE) que finalmente se rompería en ácido pirúvico y propionaldehído (probablemente por la acción de TesG), que se transformaría en propionil-CoA por acción de TesF. Por otra parte, se ha propuesto que el DOHNAA se degradaría a ácido succínico. Se asume que el primer paso en la degradación de este compuesto podría ser la eliminación de su fracción propionil para producir ácido 9,17-dioxo-1,2,3,4,5,6,10,19-octanorandrostan-7-oico a través de una  $\beta$ -oxidación típica (Kieslich, 1985).

### 2.3. Degradación anaeróbica de esteroides

Las transformaciones de esteroides más estudiadas que suceden en ambientes anóxicos tienen lugar durante la circulación enterohepática en mamíferos y son producidas por bacterias intestinales anaeróbicas. Se ha constatado la rotura de enlaces alquilaril éter, deshidroxilaciones y oxidaciones o reducciones en el carbono 17, pero no se ha descrito la rotura del núcleo esteroideo por estas bacterias para la obtención de energía (Groh et al., 1993). Un ejemplo de estos microorganismos es *Bacteroides* sp. cepa D8, primera bacteria encontrada en el colon humano capaz de convertir colesterol, 4-colesten-3-ona y coprostanona a coprostanol (Gerard et al., 2007). En 1988 se demostró por vez primera la existencia de bacterias capaces de crecer en colesterol bajo condiciones desnitrificantes (Taylor et al., 1981). Recientemente se han descrito bacterias desnitrificantes capaces de oxidar colesterol y otros esteroides completamente. Ejemplos de estos microorganismos son *Denitratisoma oestradiolicum*, capaz de degradar 17 $\beta$ -estradiol utilizando el nitrato como aceptor de electrones (Fahrbach et al., 2006); *Steroidobacter denitrificans*, degradadora de estradiol, estrona, testosterona y AD (Fahrbach et al., 2008) o las cepas 72Chol (Harder y Probian, 1997) y *Sterolibacterium denitrificans* (Tarlera y Denner, 2003), capaces de oxidar completamente el colesterol.

Aunque algunas de estas bacterias han sido caracterizadas exhaustivamente, todavía no existe mucha información sobre las rutas de degradación o las enzimas implicadas en las mismas. Los estudios más avanzados hasta el momento se han realizado con *S. denitrificans*, en el que se han propuesto los pasos iniciales de la ruta de degradación de colesterol anóxica (Chiang et al., 2007). Según estos estudios, el primer paso de la ruta hasta el metabolito 4-colesten-3-ona estaría catalizado por la enzima AcmA, una deshidrogenasa/reductasa de cadena corta NAD(P) dependiente (Chiang et al., 2008b). El segundo paso de la ruta estaría catalizado por una 4-colesten-3-ona- $\Delta^1$ -deshidrogenasa denominada AcmB (Chiang et al., 2008a; Chiang et al., 2008b). Este paso implicaría la producción de 25-hidroxi-4-colesten-3-ona mediante la hidroxilación



del carbono terciario de la cadena lateral, paso que difiere de los descritos hasta ahora para las rutas aeróbicas y que presuntamente estaría catalizado por una enzima de la familia de las molibdeno-hidroxilasas, que utilizan agua como fuente del átomo de oxígeno incorporado al sustrato (Chiang et al., 2007). Alternativamente, estos intermediarios pueden originarse como las correspondientes 1,2-deshidro estructuras, colest-1,4-dien-3-ona y 25-hidroxicolest-1,4-dien-3-ona.

### **3. Mecanismos de transporte del colesterol**

---

Hasta la fecha no existen datos consistentes que demuestren que el colesterol y otros esteroides puedan difundir a través de la membrana plasmática, por lo que necesitan sistemas de transporte que los trasladen al interior de las bacterias. Los mecanismos de transporte de colesterol y otros esteroides en bacterias todavía no se conocen en detalle. Los estudios más avanzados en este sentido se están llevando a cabo en actinobacterias.

El primer gen que se descubrió que estaba implicado en la entrada de micobacterias al interior de células eucariotas no fagocíticas se denominó *mce* (de *mycobacterial cell entry*) (Arruda et al., 1993). El genoma de *M. tuberculosis* contiene 4 operones *mce* con una organización similar. Cada operón *mce* contiene entre 9 y 13 genes entre los que se encuentran dos genes (denominados *yrbE*) que codifican dos proteínas transmembrana con homología a permeasas de los sistemas de transporte tipo ABC (Pandey and Sassetti, 2008). La energía necesaria para la translocación de los sustratos por parte de todos los sistemas *Mce* es generada por una ATPasa común a todos ellos, denominada *MceG* que pertenece a la familia *Mkl* (Joshi et al., 2006). Este gen se encuentra localizado en una región del genoma distanciada de todos los operones *mce* (Mohn et al., 2008).

De todos los sistemas *Mce*, se ha demostrado que el *Mce4* es el responsable del transporte de colesterol en *M. tuberculosis* (Pandey and Sassetti, 2008). El análisis de

las bases de datos de secuencias génicas indica que, además de *Mycobacterium*, diversas actinobacterias entre las que se incluyen los géneros *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*, tanto patógenas como saprófitas, contienen el loci *mce* (Casali and Riley, 2007).

Recientemente, se ha comprobado que el locus *mce4* de *R. jostii* RHA1 se induce durante el crecimiento en colesterol (Van der Geize *et al.*, 2007) y que distintos mutantes en este locus son incapaces tanto de captar como de crecer en colesterol (Mohn *et al.*, 2008). Esta incapacidad de crecimiento se presenta así mismo en presencia de moléculas con estructura similar como el  $\beta$ -sitosterol, el 5 $\alpha$ -colestanol y la 5 $\alpha$ -colestanona, que poseen una cadena lateral en el C-17 de 8 o más átomos de carbono, mientras que estos mutantes siguen creciendo en AD, ácido cólico y progesterona, moléculas con cadenas laterales más cortas y más polares (Mohn *et al.*, 2008).

En *M. smegmatis* se ha demostrado que el operón *mce4* está regulado por la proteína KstR, regulador de la familia TetR que actúa como represor transcripcional de genes relacionados con el metabolismo del colesterol (Kendall *et al.*, 2007). El hecho de que este locus esté presente en micobacterias saprófitas no patógenas como *M. smegmatis*, indica que su función no se limita a la virulencia (Mohn *et al.*, 2008) si no que antes de adquirir su papel en patogénesis, podría ser el responsable de la captación de sustratos esteroideos tan abundantes en la naturaleza.

En *M. tuberculosis*, mutantes en el gen *yrbE4A* así como en la ATPasa *mceG* tienen un escaso crecimiento en colesterol, aunque este se ve recuperado a tiempos largos, lo que sugiere que podría existir otro sistema de transporte secundario (Pandey y Sassetti, 2008). Así mismo, los mutantes en estos genes presentan una virulencia disminuida en modelos animales (Pandey y Sassetti, 2008).

#### 4. Regulación de la ruta de degradación del colesterol

---

La información de la que se dispone sobre la regulación de la ruta de degradación del colesterol es algo limitada. En los últimos años se han realizado algunos avances que han permitido la identificación de dos reguladores que controlan la expresión de la mayoría de los genes implicados en la degradación de este esteroide: KstR y KstR2.

Ambos represores pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales TetR. Esta familia se encuentra distribuida prácticamente en todos los grupos taxonómicos bacterianos, tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, y forma parte de los circuitos de regulación que controlan una gran variedad de procesos celulares, tales como procesos de diferenciación celular, virulencia y quorum-sensing (Ramos *et al.*, 2005). La familia TetR toma su nombre del regulador transcripcional TetR que controla la expresión de los genes *tet*, que confieren resistencia a la tetraciclina en *E. coli* (George and Levy 1983). Su mecanismo de acción consiste en la unión al DNA en una región palindrómica operadora específica del promotor, lo que bloquea la unión de la RNA polimerasa impidiendo la transcripción (Bertrand *et al.*, 1983; Orth *et al.*, 2000). Las principales estructuras tridimensionales resueltas hasta el momento indican que las proteínas de la familia TetR siempre forman dímeros (Yu *et al.*, 2010), si bien su interacción con el promotor que controlan puede originar la formación de tetrámeros, como ocurre con la proteína QacR (Schumacher *et al.*, 2002), la cual reconoce dos secuencias palindrómicas en el promotor sobre el que actúa. Estos están típicamente constituidos por nueve hélices alfa de las cuáles las tres primeras constituyen la región de unión al DNA. Las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  son las que constituyen el dominio HTH (*helix- turn- helix*), siendo la hélice  $\alpha 3$  la más importante para la interacción específica con el DNA (Orth *et al.*, 1998; Huffman and Brennan, 2002; Ramos *et al.*, 2005; Routh *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010). La distancia y la orientación relativa de las hélices  $\alpha 3$  de cada uno de las subunidades que constituyen el homodímero se ven modificadas cuando la proteína se une a la molécula inductora (Schumacher *et al.*, 2002). Los cambios conformacionales producidos en el dominio de

unión al DNA provoca la liberación de la proteína de su región operadora, permitiendo la transcripción (Ramos *et al.*, 2005). El dominio de unión al DNA está bastante conservado en los miembros de la familia TetR, tanto a nivel de secuencia primaria como terciaria. Sin embargo, el dominio carboxilo-terminal, constituido por las hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 9$  presenta una baja identidad de secuencia entre las proteínas de la familia TetR, y se ha postulado como una región importante para el proceso de dimerización de la proteína y el reconocimiento del inductor específico que inhibe su acción represora de la transcripción (Orth *et al.*, 1998). En ocasiones los reguladores de la familia TetR pueden reconocer un amplio rango de compuestos. Cada molécula de regulador suele presentar una cavidad para la unión con el ligando que posee una cierta flexibilidad, tiene forma triangular y está definida por las hélices  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$  (Gu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).

El represor KstR controla la expresión de 83 genes en *M. smegmatis* y 74 genes en *M. tuberculosis* implicados en el metabolismo del colesterol, concretamente en la parte alta y central de la ruta (Kendall *et al.*, 2007). El regulón KstR en *M. tuberculosis* contiene genes que han sido descritos como esenciales para la supervivencia de este patógeno tanto en macrófagos como en modelos de ratón (Schnappinger *et al.*, 2003), lo que pone de manifiesto la importancia de la degradación del colesterol durante los procesos de infección. La secuencia operadora de KstR ha sido predicha mediante estudios *in silico* de las regiones promotoras de los genes a los que regula. Se trata de la secuencia palindrómica TnnAACnnGTTnnA, que también se localiza en la región promotora del propio KstR. Por su parte, el represor KstR2 controla la expresión de 15 genes relacionados con la parte baja de la ruta tanto en *M. smegmatis* como en *M. tuberculosis* y su secuencia operadora también ha sido identificada (AnCAAGnnCTTGnT)(Kendall *et al.*, 2010).

Los experimentos de microarrays llevados a cabo en el laboratorio antes del comienzo de esta Tesis Doctoral, permitieron comparar la inducción de los genes en presencia de colesterol o glicerol como única fuente de carbono y energía en *M. smegmatis*. Mediante esta técnica se identificaron 89 genes que se inducían durante el

## Introducción

crecimiento en colesterol, con al menos tres veces de inducción con respecto al crecimiento en glicerol(Uhía *et al.*, 2012). Los genes catabólicos identificados se organizan en tres grandes agrupaciones génicas o *clusters*. La mayoría de ellos están implicados en el transporte el colesterol, la  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral en el C-26 (o C-27) y el catabolismo de los anillos que llevan a la formación de intermediarios que entran en el metabolismo central de la bacteria. Sin embargo, algunos de los genes cuya expresión está inducida no están incluidos dentro de estos *cluster*, si no que se encuentran aislados en otras regiones del genoma. De todos ellos, existen algunos que no contienen en su región promotora los motivos de unión a KstR o KstR2, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que existan otros sistemas de regulación adicionales (García *et al.*, 2012).

A pesar de haber sido identificados los represores encargados de la regulación de la ruta de degradación del colesterol, los mecanismos moleculares por los que éstos llevan a cabo su función no han sido muy estudiados. Sólo ha sido caracterizada la regulación mediada por KstR del promotor *P<sub>5228</sub>* de *M. smegmatis*. Este gen codifica una enzima 3- $\beta$ -HSD responsable de la transformación del colesterol en colesteno, que como se ha comentado previamente ha sido caracterizada recientemente (Uhía *et al.*, 2011b). Mediante ensayos de protección frente a la digestión con DNasa, se determinó que el KstR se une de forma específica a un región de 31 nt localizada entre las cajas -10 y -35 del promotor *P<sub>5228</sub>* (Uhía *et al.*, 2011a). Esta región contiene la secuencia palindrómica que había sido previamente identificada (AACTGgAACgtGTTtCAGTT), lo que sugirió que la proteína KstR reprime la expresión del gen *MSMEG\_5228* impidiendo la unión de la RNA polimerasa a la región promotora de dicho gen.

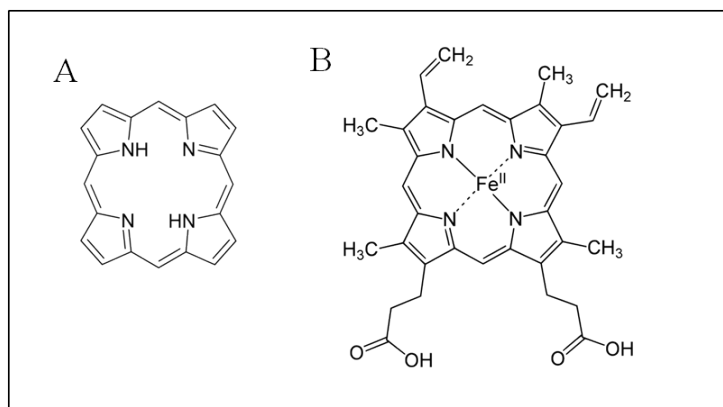
Los motivos de unión al represor KstR localizado en micobacterias también han sido localizados en el genoma de *R. jostii* RHA1 (Van der Geize *et al.*, 2007). En esta cepa los ortólogos a KstR y KstR2, codificados por los genes *ro04482* y *ro04598*, respectivamente, también están inducidos en presencia de colesterol, lo que sugiere que en esta cepa la regulación de los genes implicados en el catabolismo del colesterol podría ser muy similar a lo descrito para *Mycobacterium*.

Sin embargo, todos los experimentos llevados a cabo hasta la fecha no han permitido determinar el inductor del KstR, papel inicialmente atribuido al colesterol o la colestenoína, por ser los primeros metabolitos de la ruta de degradación. El efecto del colesterol y de la colestenoína había sido probados mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa empleando la fusión traduccional entre el promotor  $P_{5228}$  de *M. smegmatis* y el gen *lacZ* ( $P_{5228}::lacZ$ ) en presencia del represor KstR. La adición al medio de cultivo de colesterol o colestenoína no inhibía la represión de la  $\beta$ -galactosidasa mediada por KstR. Además en este mismo trabajo se demostró mediante ensayos de retardo en gel que la interacción entre el promotor  $P_{5228}$  y la proteína KstR no se veía afectada por la presencia de colesterol o colestenoína.

## 5. Citocromos P450 y su relación con los esteroides

---

Los citocromos P450 (CYPs o P450s) representan una superfamilia de de monooxigenasas que contienen un grupo hemo de tipo b. El grupo hemo es un grupo prostético constituido por un átomo de hierro coordinado con cuatro átomos de nitrógeno de la porfirina. La estructura básica de la porfirina se muestra en la figura 2 A y está compuesta por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales. Según los sustituyentes laterales que contenga las porfirinas se clasifican en mesoporfirinas, uroporfirinas, etioporfirinas y protoporfirinas. Estas últimas son las más relevantes y presentan como sustituyentes 4 metilos, 2 vinilos y 2 grupos propiónicos. El grupo hemo de tipo b está constituido por la protoporfirina IX y un átomo de hierro unido a ésta mediante cuatro enlaces de coordinación establecidos con los cuatro átomos de nitrógeno de la misma (Fig. 2 B). Además de los citocromos P450, la hemoglobina y la mioglobina son ejemplos de proteínas transportadoras de oxígeno que contienen como grupo prostético un grupo hemo de tipo b. En este caso, el hierro del grupo hemo se encuentra coordinado con una histidina de la proteína, mientras que el caso de de los citocromos P450 la coordinación se produce con el grupo tiol de una cisteína.



**Figura 2. Estructura del núcleo de la porfirina (A) y estructura del grupo hemo de tipo b (B).**

El primer citocromo P450 que se identificó fue en microsomas hepáticos (Omura and Sato, 1962) e inicialmente fueron identificados como “pigmentos” (de donde deriva la letra “P” de P450) que se unían monóxido de carbono (CO).

Los citocromos P450 están ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo bacterias, hongos, plantas, insectos y mamíferos: 57 CYPs en el genoma humano, 272 en *Arabidopsis*, 457 en arroz, 119 en el hongo *Aspergillus nidulans* y sólo 3 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Urlacher and Girhard, 2012). Teniendo en cuenta las diferencias en el tamaño del genoma de todas ellas con respecto a las bacterias, en algunas de éstas los citocromos P450 son bastante abundantes. Por ejemplo, *Streptomyces avermilitis* contiene 33 CYPs y 8 *Bacillus subtilis*. Dentro de las bacterias, los genomas de las actinobacterias presentan un número excepcionalmente elevado de citocromos: 20 CYPs en *M. tuberculosis* H37Rv, 29 CYPs en *R. jostii* RHA1 y 43 CYPs en *M. smegmatis*. Esto contrasta con la ausencia de CYPs en *E. coli* (Ouellet *et al.*, 2010b; Hudson *et al.*, 2012). Los CYPs de mamíferos, plantas y hongos están

comúnmente asociados a la membrana, lo que dificulta su manipulación. Sin embargo, los CYPs bacterianos son normalmente solubles.

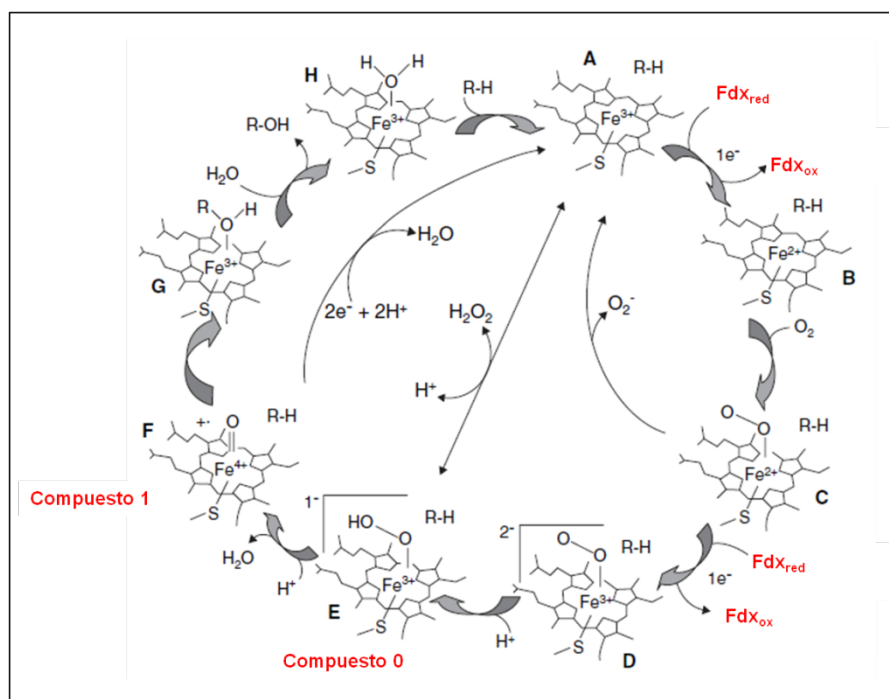
Los citocromos P450 desempeñan un papel esencial en un gran número de rutas metabólicas primarias y secundarias, así como en la degradación de drogas y compuestos xenobióticos. Estas proteínas han sido objeto de estudio por muchos químicos y bioquímicos debido a su extraordinaria capacidad de catalizar reacciones de monooxigenación de una manera regio- estereoselectiva. Algunas de las enzimas pertenecientes a esta familia presentan un estrecho rango de sustrato, principalmente las que están implicadas en rutas anabólicas, como por ejemplo en la síntesis de esteroides en animales y plantas, mientras que otros P450s presentan un amplio rango de sustrato, como ocurre con aquellos implicados en la degradación de compuestos xenobióticos (Guengerich, 1991).

Los citocromos P450 presentan unas propiedades espectroscópicas características debido a la presencia del grupo hemo. Como se ha comentado, éste se encuentra coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno de la porfirina y el grupo tiolato de una cisteína altamente conservada evolutivamente (ligando proximal). La sexta posición de coordinación normalmente está ocupada por una molécula de agua (ligando distal) (Ortiz de Montellano, 2005), aunque algunos CYPs presentan dicha posición de coordinación libre (Rowland *et al.*, 2006). En su estado estacionario, el hierro del grupo hemo se encuentra en estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ). En presencia de un agente reductor, el hierro pasa de estado férrico a estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), y en este estado se une con el CO forma complejos  $\text{Fe(II)-CO}$ . Estos complejos presentan un espectro de absorción que se caracteriza por presentar un máximo de absorción a 450 nm (de ahí la nomenclatura de P450) (Klingenberg, 1958; Omura and Sato, 1962). Este pico de absorción o banda de Soret se debe a la naturaleza de su ligando proximal, es decir, la cisteína conservada con la que interacciona el hierro. Cuando se produce la protonación del tiolato de la cisteína y se transforma en un grupo tiol, los citocromos se inactivan y presentan un pico de absorción a 420 nm (Perera *et al.*, 2003; Dunford *et al.*, 2007).



### 5.1. Ciclo catalítico y propiedades espectroscópicas de los citocromos P450.

En estado de reposo los citocromos P450 presentan el hierro del grupo hemo en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y normalmente con la sexta posición de coordinación ocupada por una molécula de agua. La presencia del sustrato en el centro activo conlleva el desplazamiento de la molécula de agua provocando una reorganización electrónica en los orbitales de tipo d, que hace que el hierro pase de estado de bajo espín a estado de alto espín (Tsai *et al.*, 1970; Jefcoate *et al.*, 1976). En este estado de alto espín la molécula presenta un mayor potencial de reducción lo que favorece la transferencia de electrones desde las proteínas redox que acompañan a los citocromos (ver apartado 5.3.). La unión del primer electrón provoca la reducción del átomo de hierro a  $\text{Fe}^{2+}$ . En este estado ferroso, el hierro es capaz de aceptar una molécula de oxígeno formando el intermediario superóxido férrico. La transferencia de un segundo electrón desde las proteínas redox reduce el hierro a  $\text{Fe}^{3+}$  formándose el intermediario peroxo, que es rápidamente protonado al estado hidroperoxo, conocido comúnmente como compuesto 0. A continuación tiene lugar la escisión del enlace entre los átomos de oxígeno y gracias a una segunda protonación se libera una molécula de agua y se forma el intermediario oxiferrilo, conocido como compuesto I. Éste tiene una elevada reactividad y ataca la molécula de sustrato, produciendo su oxidación. El producto de hidroxilado se disocia del centro activo permitiendo de nuevo la incorporación de una molécula de agua en la sexta posición de coordinación y completando así el ciclo catalítico (Munro *et al.*, 2007; Ortiz de Montellano, 2010).



**Figura xx. Ciclo catalítico de los citocromos P450.** Esquema del ciclo catalítico de los citocromos P450 donde se muestran los diferentes intermediarios del grupo hemo que se forman en cada una de las etapas. A: Desplazamiento de la molécula de agua y transición al estado de alto espín. B: Transferencia de un electrón y formación del intermediario oxiferroso. C: Unión de una molécula de oxígeno y formación del intermediario superóxido férrico. D: Transferencia del segundo electrón y formación del intermediario peroxo. E: Primera protonación y formación del intermediario hidroperoxo o compuesto 0. F: Segunda protonación y formación del intermediario oxiferrilo o compuesto 1. G: Oxidación del sustrato. H: Liberación del sustrato hidroxilado y ocupación de la sexta posición de coordinación del hierro por la molécula de agua generada (Modificado de Munro *et al.*, 2007)

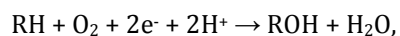
Para que tenga lugar la catálisis mediada por los citocromos P450 es imprescindible la existencia de proteínas redox que transfieran los electrones desde el NAD(P)H hasta los citocromos. Aunque existe una gran diversidad de sistemas redox asociados a los citocromos P450, tradicionalmente se han dividido en dos clases principales que se explican en detalle más adelante (apartado 5.3. de esta sección).

## Introducción

Los compuestos que se unen a los citocromos P450 se pueden dividir en dos grupos en función de los efectos que producen en el espectro de absorción de la proteína. Los sustratos de tipo I, que normalmente son moléculas hidrofóbicas, producen un incremento en la absorción de la proteína en el rango 385-395 nm y una disminución en el rango 420-425 nm. Estos cambios en el espectro de absorción se denominan transiciones de tipo I, y normalmente la realizan aquellos compuestos que actúan como sustratos de los citocromos (Schenkman *et al.*, 1967). Por otro lado, los sustratos de tipo II, que contienen al menos un átomo de nitrógeno con un par de electrones desapareado, causan una disminución de la absorción de la proteína en el rango 390-400 nm y un incremento de la misma en el rango 425-436 nm. Estas modificaciones en el espectro de absorción se denominan transiciones de tipo II y son producidas normalmente por moléculas que actúan como inhibidores. El átomo de nitrógeno de estos compuestos interacciona con el hierro ocupando la sexta posición de coordinación de éste, lo que mantiene al grupo hemo en su estado de bajo espín impidiendo la captación de electrones necesaria para el progreso del ciclo catalítico de la proteína (Schenkman *et al.*, 1967).

### 5.2. Principales reacciones de los citocromos P450

La función típica de los citocromos P450 es catalizar la oxidación de compuestos orgánicos a través del grupo hemo. Esta monooxigenación consiste en la introducción de un átomo de oxígeno procedente del oxígeno molecular en el sustrato, que frecuentemente resulta en la hidroxilación del mismo, mientras que el segundo átomo de oxígeno se reduce para formar una molécula de agua. La estequiometría de la reacción es la siguiente:



donde RH es el sustrato, ROH es el sustrato hidroxilado.

Aunque las reacciones de hidroxilación son las más frecuentes, los CYPs pueden catalizar un gran número de reacciones, tales como epoxidaciones, desalquilaciones, desaminaciones, desmetilaciones, formación y ruptura de enlaces C-C (Shyadehi *et al.*, 1996; Bernhardt, 2006; Isin and Guengerich, 2007; Ortiz de Montellano, 2010). La mayoría de los sustratos de los citocromos P450 son compuestos hidrofóbicos, como por ejemplo ácidos grasos, terpenos, esteroides, prostaglandinas, compuestos aromáticos, y también gran número de drogas, solventes orgánicos, antibióticos, carcinógenos y toxinas (Urlacher and Girhard, 2012).

### 5.3. Sistemas redox que acompañan a los citocromos P450

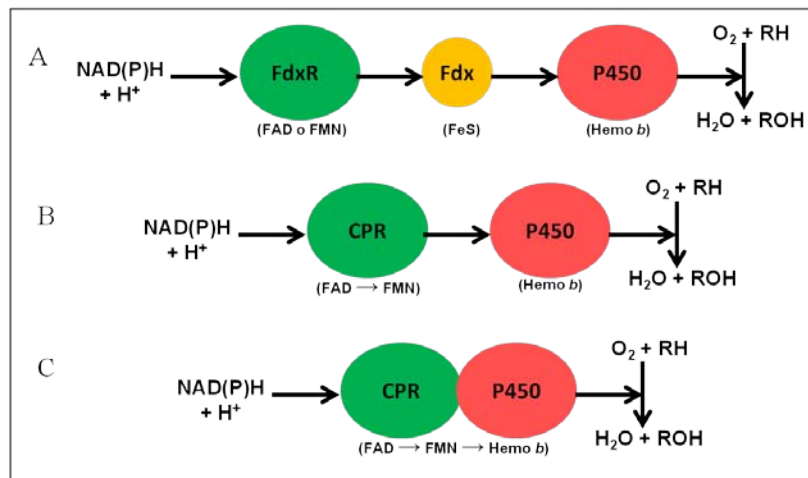
Como se ha comentado los CYPs necesitan dos electrones para poder realizar las reacciones de monooxigenación. Estos electrones son transferidos normalmente desde el NAD(P)H mediante proteínas transportadoras de electrones. Éstas junto con los CYPs constituyen lo que se denominan sistemas redox de los citocromos P450. Estos sistemas se han clasificado tradicionalmente en dos grupos (Munro *et al.*, 2007; Munro *et al.*, 2013).

- Sistemas redox de clase I (Sistema de tres componentes): Estos sistemas están constituidos por una proteína de unión a hierro y azufre, denominada ferredoxina (Fdx), y una NADPH reductasa que contiene una molécula de FAD o FMN, denominada ferredoxina reductasa (FdxR) (Fig. 3A). La ferredoxina reductasa toma los electrones del NAD(P)H y los transporta a través de la coenzima FAD o FMN a la ferredoxina, que es la encargada directa de la transferencia al citocromo P450. Los citocromos bacterianos son el ejemplo clásico de este grupo, siendo los tres componentes solubles. También pertenecen a esta clase los citocromos mitocondriales. En este caso el citocromo está anclado a la membrana mitocondrial interna y las proteínas redox (que reciben el nombre de adrenoxina y adrenoxina reductasa) se encuentran solubles en la matriz mitocondrial. El parecido entre los

## Introducción

sistemas bacterianos y mitocondriales refleja la relación evolutiva entre las bacterias y las mitocondrias.

- Sistemas redox de clase II (Sistema de dos componentes): En estos sistemas sólo existe una proteína encargada de transferir los electrones desde el NAD(P)H hasta el citocromo. Se trata de una citocromo P450 reductasa (CPR) que presenta un dominio FAD y uno FMN (Fig. 3B). Los citocromos microsomales hepáticos son el ejemplo clásico de este grupo y se caracterizan porque ambas proteínas se encuentran ancladas a la membrana.



**Figura 3. Sistemas redox que acompañan a los citocromos P450.** (A) Sistema redox de tres componentes. (B) Sistema redox de dos componentes. (C) Sistema redox monocomponente. Las flechas indican el sentido de la transferencia de electrones. Fdx: ferredoxina reductasa; Dx: ferredoxina; P450: citocromo P450; CPR: citocromo P450 reductasa; FAD: flavín adenín dinucleótido; FMN: flavín mononucleótido.

Además de estos dos grupos clásicos, en los últimos años ha surgido otro tipo de sistemas P450 redox que están constituidos por una proteína de fusión con dos dominios, un dominio P450 y un dominio CPR. Se trata de sistemas monocomponentes. El dominio CPR toma los electrones directamente del NAD(P)H y los transfiere al dominio P450 (Fig. 3C). Hasta la fecha estos sistemas ha sido identificados únicamente

en bacterias. El primero de ellos fue aislado en *Bacillus megatorium* y a este tipo de sistemas se les denominó P450-BM3 (Munro *et al.*, 2002; Whitehouse *et al.*, 2012).

## **6. Degradación aeróbica del colesterol en *Mycobacterium***

---

El género *Mycobacterium* es el único de la familia *Mycobacteriaceae*, del orden *Actinomycetales*. Las micobacterias son bacterias aerobias con forma de bacilos rectos o ligeramente curvados y miden 0,2-0,6 µm de ancho por 1,0-10 µm de largo. Poseen un contenido en G+C muy elevado (62-70%). Son bacterias típicamente ácido-alcohol resistentes aunque suelen considerarse Gram-positivas. Todas las especies de *Mycobacterium* comparten una característica pared celular, más gruesa que la de muchas otras bacterias, hidrofóbica y rica en ácidos micólicos y lípidos. Esta pared celular proporciona una contribución sustancial a la resistencia de este género de bacterias. El género incluye patógenos que causan graves enfermedades en los mamíferos, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. leprae*, y también saprófitos de vida libre, no patógenos u oportunistas, como *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. phlei* o *M. fortuitum*.

Aunque ya se sabía desde hacía mucho tiempo que estas bacterias degradaban colesterol, sólo muy recientemente se han realizado estudios moleculares sobre la degradación aeróbica del colesterol con cepas de *Mycobacterium*. Como ya se ha comentado anteriormente, no hace mucho se postuló que los *Mycobacterium* de crecimiento rápido, por lo general no patógenos, eran capaces de crecer en colesterol como única fuente de carbono y energía, en tanto que los de crecimiento lento, que incluyen a los *Mycobacterium* patógenos, podían acumular y modificar el colesterol pero no utilizarlo como fuente de carbono y energía (Av-Gay and Sobouti, 2000). Esta teoría ha sido recientemente refutada al comprobarse que *M. tuberculosis* sí puede crecer en colesterol (Pandey and Sassetti, 2008; Brzostek *et al.*, 2009).

Gracias a que el genoma de *M. smegmatis* se ha secuenciado recientemente, se describieron por primera vez dos genes, *ksdD1* y *ksdD2*, que podrían estar implicados

## Introducción

en la ruta de degradación del colesterol (paso de AD a ADD) y que codifican dos posibles 3-cetoesteroide- $\Delta$ 1-deshidrogenasas (Brzostek *et al.*, 2005). Poco tiempo después, se describió un gen que codifica una enzima KstH (Andor *et al.*, 2006), y que podría estar implicado en el paso de ADD a  $9\alpha$ -hidroxi-1,4-androstadien-3,17-diona.

Profundizando en el papel del colesterol en la patogénesis causada por estas bacterias, hay que señalar que desde hace tiempo se ha relacionado la entrada de diversas bacterias patógenas en células del sistema inmune y su mantenimiento dentro de las mismas con dominios de la membrana plasmática de estas células ricos en colesterol. Este es el caso por ejemplo de *M. tuberculosis* o *M. bovis* Calmette-Guérin en macrófagos; este proceso, que requiere de dominios ricos en colesterol en la membrana del macrófago, a los que las micobacterias se unen específicamente a través del colesterol, supone que las micobacterias que penetran en el interior del macrófago queden 'secuestradas' en fagosomas recubiertos de TACO (proteína de cubierta que contiene triptófano y aspartato) que previene la fusión lisosomal y asegura la supervivencia intracelular del patógeno (Gatfield and Pieters, 2000). Estos dominios ricos en colesterol también son necesarios para la entrada de *M. kansasii* (Peyron *et al.*, 2000) o *Bordetella pertussis* (Lamberti *et al.*, 2008) en neutrófilos. Se especula que la unión específica de las micobacterias al colesterol podría deberse al alto contenido en glicolípidos de su pared celular (Gatfield y Pieters, 2000). Por otra parte, se ha visto que el operón *mce4* de *M. tuberculosis*, que está en general presente en los Actinomycetales (Casali and Riley, 2007) y que codifica un sistema de importación de colesterol, es esencial para la supervivencia del patógeno durante los tiempos prolongados de infección (Sasseti and Rubin, 2003; Joshi *et al.*, 2006). Este hallazgo hizo que se investigase y que finalmente se verificase la capacidad del patógeno de crecer en colesterol como única fuente de carbono y energía. Se postula que esta capacidad para degradar el colesterol la hereda de sus ancestros saprofitos, y que puede permitir a la bacteria aprovechar este esteroide para conseguir carbono y energía en un compartimento intracelular que de hecho causa la inanición de otros patógenos potenciales (Pandey and Sasseti, 2008). Además se ha comprobado que los mutantes

de *M. tuberculosis* en el gen *choD* presentan una patogenicidad atenuada (Brzostek *et al.*, 2009).

Por otro lado, hay que destacar que desde hace tiempo se sabe que el colesterol puede sintetizarse también en bacterias (Hayami *et al.*, 1979; Weeks y Francesconi, 1978). No hace mucho se ha descrito que *M. smegmatis* es capaz de sintetizar *de novo* este compuesto y que *M. tuberculosis* y *M. leprae* poseen genes homólogos a los genes responsables de la biosíntesis del colesterol en levaduras (Lamb *et al.*, 1998). Más aún, en *M. tuberculosis* se ha caracterizado una actividad esterol 14 $\alpha$ -demetilasa (CYP51) (Podust *et al.*, 2004) correspondiente a un citocromo P450 homólogo al que está implicado en la biosíntesis de esteroides en hongos y que se ha estudiado exhaustivamente, ya que podría constituir una excelente diana para desarrollar fármacos antifúngicos. La coexistencia en *Mycobacterium* de una ruta biosintética y otra degradativa para el colesterol, resulta muy interesante a la vez que plantea interrogantes.

Aunque en los últimos años se ha avanzado mucho en el estudio del catabolismo del colesterol en bacterias, algunas de las etapas bioquímicas de la ruta así como mecanismos de regulación de la misma no han sido completamente descritos. Por todo ello, al inicio de esta Tesis Doctoral parecía interesante abordar el estudio de algunas de las enzimas implicadas en la ruta de degradación así como avanzar en el estudio de la regulación de la expresión de los genes implicados en ella. Para ello se empleó la bacteria *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 (Snapper *et al.*, 1990). Se trata de una bacteria de crecimiento rápido en medios ricos y medios sintéticos simples, que se ha desarrollado y utilizado internacionalmente como cepa modelo para el estudio de las micobacterias por su alta eficacia de transformación. Su velocidad de crecimiento en colesterol, en donde alcanza densidades ópticas a 600 nm próximas a 2 y donde llega a fase estacionaria aproximadamente en 48 h, la convierten en un buen candidato para el estudio de esta ruta de degradación. Su genoma completo ha sido además secuenciado recientemente. El interés surge principalmente desde un punto de vista medioambiental, pero teniendo también en cuenta que por tratarse de una especie muy



## Introducción

próxima a *M. tuberculosis*, los resultados que se obtuviesen podrían extrapolarse fácilmente a este patógeno. Esta extrapolación resultaría muy interesante dada la relación del colesterol con los mecanismos de patogenicidad en *M. tuberculosis*.

## **IV.MATERIALES Y METODOS**



## 1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 1 junto con sus genotipos y características más relevantes. Los plásmidos empleados para la clonación, mutación y expresión génica, junto con sus características más importantes se muestran en la Tabla 2. Todos los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron adquiridos en Sigma-Genosys y se muestran en la Tabla 3, donde además de su secuencia se indica también la aplicación para la que fueron utilizados.

Tabla 1. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo/Fenotipo	Referencia
<b><i>Mycobacterium smegmatis</i></b>		
mc <sup>2</sup> 155	ept-1 , mutante de mc <sup>2</sup> 6 eficiente para electroporación	(Snapper <i>et al.</i> , 1990)
ΔCyp125	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con el gen <i>MSMEG_5995</i> deleciónado	Este trabajo
ΔCyp142	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con el gen <i>MSMEG_5918</i> deleciónado	Este trabajo
ΔCyp125ΔCyp142	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con los genes <i>MSMEG_5995</i> y <i>MSMEG_5918</i> deleciónados	Este trabajo
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH10B	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ), Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>l-</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
DH5α	F <sup>-</sup> , Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rK-</i> , <i>mK+</i> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> ( <i>rB-mB-</i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , λDE3 (portador del <i>gen 1</i> de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor <i>P<sub>lacUV5</sub></i> )	(Sambrook and Russell, 2001)

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia
pJQ200x	Vector de clonación no replicativo en micobacterias usado para la construcción de mutantes por recombinación homóloga, <i>P15A ori, sacB, Gm<sup>R</sup>, xylE</i>	(Jackson <i>et al.</i> , 2001)
pJQUD5995	pJQ200x que contiene los fragmentos <i>UP-5995</i> y <i>DOWN-5995</i> empleado para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp125, <i>Gm<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pJQUD5918	pJQ200x que contiene los fragmentos <i>UP-5918</i> y <i>DOWN-5918</i> empleado para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp142, <i>Gm<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pMV261	Vector de expresión en micobacterias bajo el control del promotor <i>P<sub>Hsp60</sub></i> , <i>Km<sup>R</sup></i>	(Stover <i>et al.</i> , 1991)
pMV5995	pMV261 que contiene el gen <i>MSMEG_5995</i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI-HindIII</i> y empleado en la complementación del doble mutante $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 con el citocromo CYP125A3, <i>Km<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pCWori+	Plásmido derivado de pHSe5 usado para expresar citocromos P450 en <i>E. coli</i> que contiene dos promotores <i>P<sub>tac</sub></i> colocados en tándem, <i>oriM13, trpA, Ap<sup>R</sup>, lacI</i>	(Barnes <i>et al.</i> , 1991)
pCW125 <sub>SM</sub>	pCWori+ que expresa el citocromo CYP125A3 fusionado a un <i>tag</i> de 6 histidinas en su extremo carboxilo-terminal, <i>Ap<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pCW142 <sub>SM</sub>	pCWori+ que expresa el citocromo CYP142A2 fusionado a un <i>tag</i> de 6 histidinas en su extremo carboxilo-terminal, <i>Ap<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pET29a(+)	Vector de clonación e hiperexpresión, <i>Km<sup>R</sup>, oriColE1</i>	Novagen
pET6042	Vector pET29a(+) que expresa el regulador KstR fusionado a un <i>tag</i> de 6 histidinas en su extremo carboxilo-terminal, <i>Km<sup>R</sup></i>	(Uhía <i>et al.</i> , 2011)
pUJ9	Vector que contiene el gen <i>lacZ</i> sin promotor, <i>Ap<sup>R</sup></i>	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pUJ9PQ3	pUJ9 que contiene el promotor artificial <i>P<sub>Q3</sub></i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/BamHI</i> , <i>Ap<sup>R</sup></i>	Este trabajo
pJCD01	Plásmido que contiene el sitio múltiple de clonación del plásmido pUC19 flanqueado por los terminadores <i>rpoC</i> y <i>rrnBT1T2</i> , <i>oriColE1, Ap<sup>R</sup></i>	(Marschall <i>et al.</i> , 1998)
pJCDPQ3	pJCD01 que contiene el promotor <i>P<sub>Q3</sub></i> clonado entre las dianas de restricción <i>EcoRI/PstI</i>	Este trabajo

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.** Las secuencias subrayadas corresponden a las dianas de restricción incluidas para permitir su clonación. En negrita se indica la secuencia correspondiente al *tag* de 6 histidinas incluido para facilitar la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. Entre paréntesis se indican las dianas empleadas para la clonación.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Utilización
UP5995_F	GCTATCTAGACGAACTGGTTGGGCATGTCTG	Amplificación del fragmento <i>UP-5995</i> para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp125 ( <i>XbaI-SpeI</i> )
UP5995_R	GCTAACTAGTCAGGGTCGCGTCGAGGAAG	
DOWN5995_F	CAGTACTAGTGGTAAGGCGTCGGTCTCCG	Amplificación del fragmento <i>DOWN-5995</i> para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp125 ( <i>SpeI-SacI</i> )
DOWN5995_R	CAGTGAGCTCCGGGGTCTTGGTCAGCGTC	
UP5918_F	CAGTTCTAGAGCGATGGTCATCCTCATGCTG	Amplificación del fragmento <i>UP-5918</i> para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp142 ( <i>XbaI-BamHI</i> )
UP5918_R	CAGTGGATCCGTAGAACATGCCGTTGACCAG	
DOWN5918_F	CGATGGATCCCGATGCCCGTGGTGTTCAC	Amplificación del fragmento <i>DOWN-5918</i> para la construcción del mutante $\Delta$ Cyp142 ( <i>BamHI-SacI</i> )
DOWN5918_R	CGATGAGCTCCGGGATACGCGTGACGACG	
5995_F	CTAGCATATGCCACGCCGAACATCCC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5995</i> para su clonación en pCWori+ ( <i>NdeI-HindIII</i> )
5995_R	CTAGAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCGACCGGGCAGG	
5918_F	GACTCATATGACGCAGATGCTCACCAGG	Amplificación del gen <i>MSMEG_5918</i> para su clonación en pCWori+ ( <i>NdeI-HindIII</i> )
5918_R	GACTAAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGCGACAGGTGCGCTC	
pMV5995_F	CGGAATTCTGACCTAAGGAGGTGAATATGCC CACGCCGAACATC	Amplificación del gen <i>MSMEG_5995</i> para su clonación en pMV261 ( <i>EcoRI-HindIII</i> )
pMV5995_R	CGAAGCTTGTGTTGTCAGTGGGCGACCG	
5228FP_F	TCAGCGCGTCGAGCAGGC	Amplificación de la sonda 5228FP
5228 FP_R	GCAGTTCGGTGACCAGGTTG	
pUJPQ_F	GAATTCGTAAGTGCAGAGTGACCATTAAG	Amplificación del promotor PQ3 para su clonación en pCD01 ( <i>EcoRI-PstI</i> )
pUJPQ_R	CTGCAGGTTTCCCAAGTACGACGTTG	

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Utilización
pJCD01_F	CCCCAGACCTGCGTTCAG	Amplificación de la sonda PQ3
pJCD01_R	GTCTTTCGACTGAGCCTTTC	
2758int_F	CTTGAGGTGACCGACGATCTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_2758</i> (131 pb) para análisis mediante qRT-PCR
2758int_R2	GCATCAGCTTCTTCTCCTCG	
5918int_F	CGACGAGACCAACCGGCACAC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_5918</i> (193 pb) para análisis mediante qRT-PCR
5918int_R	CAGCTCGGTGCCGTGGAACAC	
4829int_F	GAGGTGTTGCGGGAATTC	Amplificación de un fragmento interno del gen <i>MSMEG_4829</i> (147 pb) para análisis mediante qRT-PCR
4829int_R	GATCACGGTCAGGTACAGC	

## 2. Medios y condiciones de cultivo

Todas las soluciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión, o mediante filtración utilizando filtros estériles Millipore de 0,2 micras de diámetro.

### 2.1. Medios de cultivo empleados para *E. coli*

Los medios ricos utilizados para cultivar las células de *E. coli* fueron el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook and Russell, 2001) o el medio Terrific Broth (TB) (Tartoff and Hobbs, 1987) (12 g l<sup>-1</sup> de triptona, 24 g l<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 12.5 g l<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.3 g l<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y suplementado con 0.4% de glicerol y 2 g l<sup>-1</sup> de bactopectona) . Los cultivos en medio sólido se realizaron con medio LB al que se adicionó Bacto Agar (Pronadisa) al 1.5% (p/v).

## 2.2. Medios de cultivo empleados para *M. smegmatis*

Para el cultivo de micobacterias se utilizaron los medios ricos Bacto Middlebrook 7H10 Agar (Difco) y LB con 1,5% de agar como medios sólidos, y Middlebrook 7H9 Broth (Difco) y LB como medios líquidos. Los medios Bacto Middlebrook 7H9 Broth y 7H10 Agar fueron suplementados con 0.2 % de glicerol (v/v) y 10 % (v/v) de Middlebrook ADC Enrichment (Difco) (fórmula aproximada por litro de agua: NaCl (8.5 g), albúmina bovina (Fracción V) (50 g), dextrosa (20 g), catalasa (0,03 g)). En todos los cultivos en medio líquido se adicionó 0.05 % (v/v) de Tween-80 para evitar la agregación de las células.

Para los cultivos líquidos en medio mínimo se empleó como base el medio 7H9 sin suplementos (sin glicerol y sin ADC) y se adicionó glicerol 18 mM, colesterol 1.8 mM o colesteno 1.8 mM como fuente de carbono según correspondiera. En estos casos, como los esteroides se prepararon en tyloxapol (ver apartado siguiente) que actúa como un detergente, no fue necesario añadir Tween-80. La concentración final de tyloxapol en el medio de cultivo siempre fue inferior a 3.6 % (v/v).

## 2.3. Protocolo de disolución de esteroides

Los esteroides son moléculas altamente hidrofóbicas, por lo que es necesario disolverlas de manera especial para conseguir una solución homogénea que no produzca turbidez y que permita seguir espectroscópicamente el crecimiento de los cultivos en medio líquido así como la realización de otras técnicas espectroscópicas (ensayos de unión a sustrato, dicroísmo circular, ultracentrifugación analítica) y los ensayos de retardo gel y transcripción *in vitro*. La preparación de esteroides se realizó de maneras diferentes dependiendo del experimento donde fueran a ser utilizados.

Para los cultivos celulares en medio mínimo en los que se emplearon los esteroides como única fuente de carbono, éstos se disolvieron en 10 % (v/v) de



## Materiales y Métodos

tyloxapol (Sigma) a una concentración de 5 mM. Para conseguir la disolución completa de los esteroides, estas soluciones se sonicaron a 80 °C durante aproximadamente 30 min (o hasta conseguir la completa disolución) y posteriormente fueron autoclavadas.

Para los ensayos de unión a esteroides realizados con los citocromos P450 estudiados en este trabajo el colesterol y la colesteno se disolvieron a una concentración de 10 mM en una solución de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) al 10 % (p/v) preparada en PBS (tampón fosfato pH 7.4) en un baño de agua a 80 °C con agitación magnética.

Por último, para los ensayos de dicróismo circular, ultracentrifugación analítica, ensayos de retardo en gel y transcripción *in vitro*, los diferentes esteroides y ácidos grasos ensayados se disolvieron en metanol.

### 2.4. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones acuosas 1000 veces concentradas, a excepción de la ampicilina, que se preparó 250 veces. Las soluciones preparadas se esterilizaron por filtración y se conservaron a -20 °C. Los antibióticos se utilizaron a las concentraciones finales que se indican a continuación. Para *E. coli*: ampicilina (Ap, 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamicina (Km, 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), gentamicina (Gm, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para *M. smegmatis*: kanamicina (Km, 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y gentamicina (Gm, 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

### 2.5. Condiciones de cultivo

Las células de *E. coli* y *M. smegmatis* se cultivaron a 37 °C. Los cultivos en medio líquido se llevaron a cabo en un agitador orbital a 250 r.p.m. El crecimiento en medio líquido fue seguido por turbidimetría a 600 nm ( $\text{DO}_{600}$ ) empleando un espectrofotómetro UVmini-1240 (SHIMADZU).

## 2.6. Conservación de las cepas bacterianas

Durante periodos inferiores a un mes las cepas se conservaron a 4 °C en placas de LB o 7H10. Para su conservación a largo plazo las cepas de *E. coli* fueron crecidas en LB con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 20% (v/v) de glicerol. En el caso de *M. smegmatis* las cepas se crecieron en medio 7H9/ADC/Tween con los antibióticos correspondientes y congeladas a -80 °C con 50% (v/v) de glicerol.

## 3. Experimentos de transferencia genética

---

### 3.1. Transformación de células de *E. coli*

Las células de *E. coli* fueron modificadas genéticamente por transformación tras hacerlas competentes mediante el método de RbCl y choque térmico (Sambrook and Russell, 2001).

### 3.2. Transformación de células de *M. smegmatis*

#### 3.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se llevó a cabo según un protocolo descrito previamente (Parish and Stoker, 1998). En primer lugar, se siembra una colonia de la cepa de micobacteria correspondiente en 10 ml de medio 7H9-glicerol-ADC conteniendo 0,05 % (v/v) de Tween-80 y se incuba a 37 °C hasta alcanzar la fase estacionaria (aproximadamente 30 horas en *M. smegmatis*). Con 2 ml de este cultivo se inoculan 200 ml de medio 7H9-glicerol-ADC conteniendo 0,05 % (v/v) de Tween-80 y se incuba en agitación (80 r.p.m.) a 37 °C hasta una DO<sub>600</sub> de 0.8-1 (18 horas de cultivo aproximadamente). A continuación el cultivo se incuba 1.5 h en hielo y

se centrifuga repartido en 4 tubos Falcon de 50 ml a 3000 g a 4 °C durante 10 min. Una vez decantado el sobrenadante, se resuspenden las células en 200 ml de una solución de glicerol 10 % (v/v)- Tween-80 0.05 % (v/v) enfriada en hielo. Tanto en este paso como en las etapas posteriores se resuspenden las células volteando el recipiente, nunca con vórtex, ni pipeteando. Seguidamente se centrifuga la suspensión de células, se retira el sobrenadante y se resuspenden de nuevo en 100 ml de la misma solución glicerol- Tween-80 fría. Tras un tercer paso de centrifugación se añaden 25 ml de glicerol- Tween-80 frío. Las células se resuspenden volteando y se dejan reposar para sedimentar los agregados que no se resuspenden. Posteriormente se toma la suspensión sin los agregados con una pipeta estéril. La suspensión se lleva a un tubo Falcon limpio enfriado en hielo y se centrifuga. Finalmente se retira el sobrenadante, se resuspenden las células en 1,5 ml de glicerol- Tween-80 frío y se reparten en alícuotas de 200 µl que se guardan a -80 °C hasta su uso.

### 3.2.2. Transformación de células de *M. smegmatis* mediante electroporación

A una alícuota de 200 µl de células electrocompetentes se añade el DNA con el que se va a transformar (en el caso de plásmidos se recomienda transformar con 1 µg de DNA). Esta mezcla se pasa a una cubeta de electroporación (Cell Projects), y se incuba durante 10 min en hielo. A continuación se electropora en un electroporador Gene Pulser (Biorad) a 2,5 Kv, 25 µF y 1000 Ω y se incuba la cubeta en hielo otros 10 min. Posteriormente se añade 1 ml de medio 7H9-ADC-Tween a la cubeta y el líquido se pasa a un tubo Falcon de 15 ml. Las células se incuban 4 h a 37 °C en agitación antes de sembrarlas en medio sólido 7H10-ADC con los antibióticos necesarios.

## 4. Técnicas de manipulación de DNA

---

La manipulación del DNA así como la mayor parte de las técnicas de biología molecular utilizadas en este trabajo fueron aplicadas esencialmente tal y como describen Sambrook y Russell (2001). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por New England Biolabs y Takara. Las enzimas T4 DNA ligasa y RNA polimerasa utilizada en los ensayos de transcripción *in vitro* (*E. coli* RNA Polymerase Holoenzyme 1 U/ $\mu$ l) fueron suministradas por USB (Amersham). La DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa fueron suministradas por Biotools B. M. Labs. Todas las enzimas se emplearon atendiendo a las especificaciones de las diferentes casas comerciales. Los fragmentos de DNA se purificaron mediante los kits GeneClean Turbo (Q-BIOgene) o High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

### 4.1. Electroforesis en geles de agarosa

Para visualizar los fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa al 0.7 % o al 1.5 % en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM pH 8.1), utilizando el mismo tampón como electrolito. A las muestras se les añadió  $\frac{1}{4}$  de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% (p/v) y EDTA 40 mM pH 8.0. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15-20 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con bromuro de etidio ( $5\mu\text{g ml}^{-1}$ ) o GEL-RED y los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta en un transiluminador. Como marcadores de tamaño se utilizaron el DNA del fago  $\lambda$  digerido con la enzima de restricción *Bst*EII (Amersham), y la forma replicativa del fago  $\Phi$ X174 digerida con *Hae*III (New England Biolabs).

#### **4.2. Extracción DNA cromosómico de *M. smegmatis***

Para realizar la extracción de DNA cromosómico de *M. smegmatis* se emplea la biomasa procedente de un cultivo de 15 ml en medio 7H9-ADC-Tween o LB-Tween o de una placa de 7H10 o LB. Las células se resuspenden en 400 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) y se incuban a 80 °C durante 20 min. Se dejan enfriar a temperatura ambiente y se añade 50 µl de lisozima (10 mg ml<sup>-1</sup>), se mezcla con vórtex y se deja 1-12 h a 37 °C. A continuación se añaden 75 µl de SDS al 10% conteniendo proteinasa K (10 mg ml<sup>-1</sup>), se mezcla con vórtex y se incuba 10 min a 65 °C. Posteriormente se añaden 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de CTAB/NaCl precalentados a 65 °C y se incuba durante 10 min a 65 °C. Seguidamente se añaden 750 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcla con vórtex y se centrifuga 5 min a 14000 g. La solución acuosa se toma con pipeta, se transfiere a un tubo eppendorf y se añade un volumen equivalente de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), se mezcla con vórtex y se centrifuga 5 min a 14000 g. La solución acuosa se toma con pipeta y se transfiere a un eppendorf donde el DNA se precipita con 0,6 volúmenes de isopropanol y se mantiene 30 min a 20 °C. Finalmente el DNA se centrifuga 15 min a 14000 g a 4 °C, se lava con etanol al 70 %, se centrifuga 2 min a 14000 g y se seca el precipitado que posteriormente se resuspende en 40-100 µl de TE.

#### **4.3. Aislamiento de DNA plasmídico en *E.coli* y *M. smegmatis***

La extracción de DNA plasmídico de células *E. coli* se llevó a cabo empleando el sistema High Pure Plasmid Purification Kit (Roche), de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El aislamiento de DNA plasmídico de *M. smegmatis* se realiza para comprobar si las células han adquirido el plásmido con el que fueron transformadas. Para ello se realiza una extracción de DNA de la cepa que se desea comprobar tal y como se explica en el apartado anterior. El DNA total extraído, que contendrá tanto el DNA

cromosómico como el DNA plasmídico, se emplea para transformar mediante choque térmico células de *E. coli*. Las células transformadas se seleccionan y se realiza la extracción de DNA plasmídico para comprobar que dicho plásmido es el que se había transformado previamente en *M. smegmatis*.

#### **4.4. Reacción de amplificación en cadena con DNA polimerasa termorresistente (PCR)**

La amplificación del DNA se realizó en un equipo Mastercycler Gradient de Eppendorf y las enzimas que se emplearon fueron la DNA polimerasa I y la *Pfu* polimerasa, ambas proporcionadas por Biotools B. M. Labs. Las mezclas de reacción contenían 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de dNTPs, 5 % de DMSO y 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos. Los productos amplificados se purificaron con el sistema High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

##### **4.4.1. PCR de colonia en *E. coli***

Una de las maneras de comprobar si las células de *E. coli* transformadas contienen la construcción de DNA con la que han sido transformadas consiste en la amplificación mediante PCR de una región de dicho DNA empleando directamente células enteras. Para ello, una pequeña cantidad de biomasa de la colonia que se desea chequear se resuspende en la mezcla de reacción de PCR y a continuación se lleva a cabo el protocolo de amplificación habitual.

##### **4.4.2. PCR de colonia o de cultivo líquido en *M. smegmatis*.**

Una manera rápida de comprobar si las células de *M. smegmatis* han incorporado una construcción (por ejemplo, cuando se construyen las cepas mutantes) consiste en la amplificación por PCR de una región de DNA incluida en dicha construcción. Esto puede realizarse a partir de una pequeña cantidad de biomasa de

una colonia o a partir de la biomasa obtenida por centrifugación de 100 µl de un cultivo líquido en fase exponencial. La biomasa obtenida se resuspende en 50 µl de TE y se incuba durante 10 min a 80 °C. Posteriormente se añaden 5 µl de esta suspensión a 45 µl de mezcla de reacción de PCR y se somete al protocolo de amplificación habitual.

### 4.5. Secuenciación de DNA

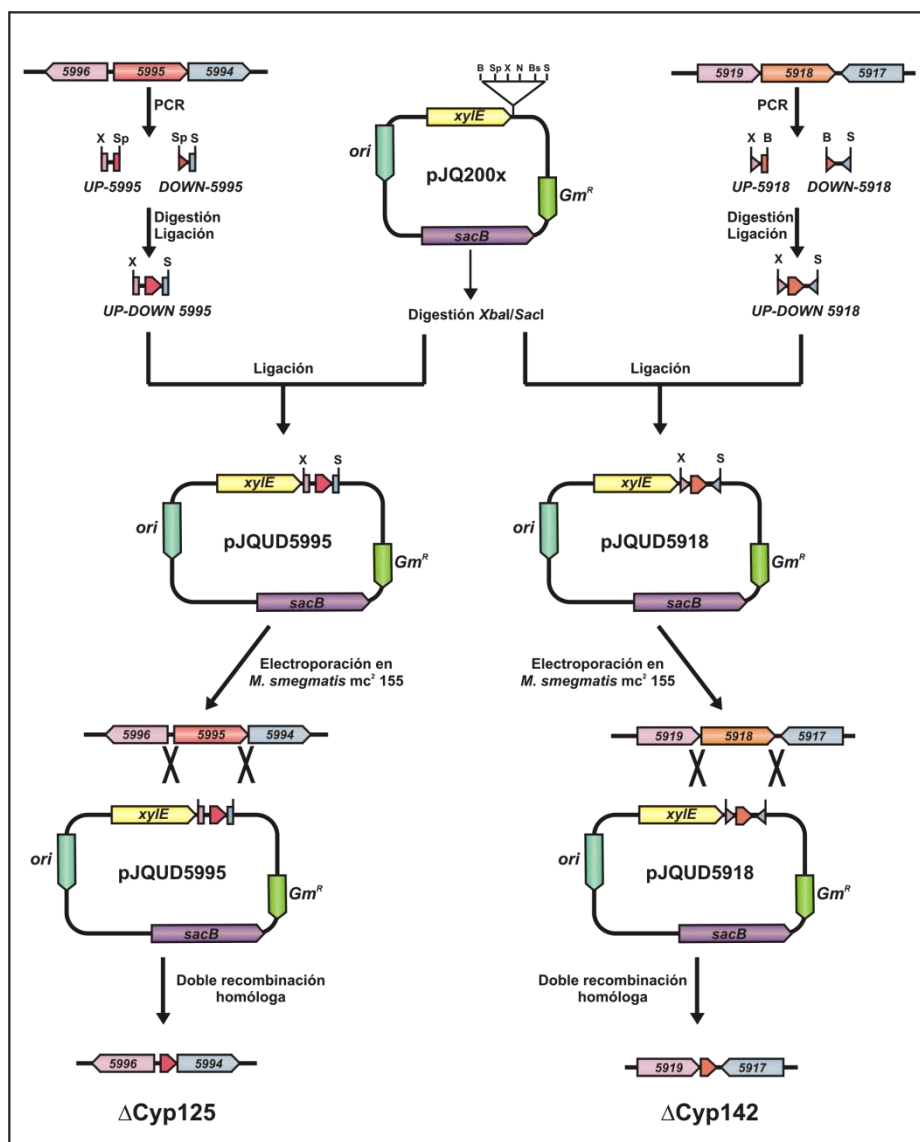
La secuenciación de DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) (SECUGEN, SL) utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa AmpliTaq FS, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador “Gene Amp PCR System 2400” de Perkin-Elmer.

### 4.6. Construcción de mutantes por delección mediante doble recombinación homóloga en *M. smegmatis*

La construcción de cepas mutantes en los genes *MSMEG\_5995* (CYP125A3) y *MSMEG\_5918* (CYP142A2) se realizó mediante delección por doble recombinación homóloga. En primer lugar se amplificaron por PCR dos fragmentos de aproximadamente 600 pb, uno en posición 5' al gen a mutar (*UP-5995* y *UP-5918*), y otro en posición 3' (*DOWN-5995* y *DOWN-5918*). Los fragmentos UP y DOWN se digirieron con las enzimas de restricción correspondientes para hacer sus extremos compatibles y posteriormente se incubaron con la T4 DNA ligasa. Los fragmentos UP-DOWN de cada gen se clonaron en el plásmido no replicativo en micobacterias pJQ200x (Jackson *et al.*, 2001). Este plásmido presenta como marcadores de selección el gen de resistencia a gentamicina, el gen *sacB*, que codifica una levansacarasa de *Bacillus subtilis* cuya expresión es letal para la bacteria cuando crece en sacarosa, y el gen *xylE*, que

codifica una catecol-2,3-dioxigenasa que en presencia de catecol produce el compuesto 2-hidroxi-mucónico semialdehído, caracterizado por una coloración amarilla. Los plásmidos resultantes pJQUD5995 y pJQUD5918 (Fig. 4) fueron transformados en células de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 mediante electroporación y los transformantes se seleccionaron en placas de medio 7H10 con gentamicina. Las colonias resistentes a gentamicina se replicaron en placas de 7H10-sacarosa 10 % (p/v). Se seleccionaron las colonias resistentes a gentamicina, sensibles a sacarosa y que portaban el gen xylE (comprobado por la adquisición de coloración amarilla cuando se adiciona sobre la colonia entre 10-15 µl de catecol). Estas colonias han sufrido una recombinación simple y todo el vector está integrado en el cromosoma. Para forzar una segunda recombinación se crece la colonia en 10 ml de medio 7H9 con gentamicina hasta una DO<sub>600</sub> aproximada de 0.8-0.9, momento en el cual se sembraron 20 µL de una dilución ½ del cultivo en una placa de 7H10 y otros 20 µl en una placa de 7H10 con 10 % de sacarosa. En la placa con sacarosa se deben obtener alrededor de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> colonias menos, lo que indica que ha tenido lugar la segunda recombinación.





**Figura 4. Construcción de los mutantes simples  $\Delta$ Cyp125 y  $\Delta$ Cyp142 de *M. smegmatis* mediante deleción por recombinación homóloga.** Los detalles de la construcción se indican en el texto. Por simplificar sólo se muestran algunas de las dianas de restricción del plásmido pJQ200x. B: *Bam*HI; Sp: *Spe*I; X: *Xba*I; N: *Not*I; Bs: *Bst*I; S: *Sac*I.

Las colonias crecidas en presencia de sacarosa se replicaron en placas de 7H10 con gentamicina y 7H10 con 10 % de sacarosa. Aquellas colonias sensibles a gentamicina, que no portan el gen *xyIE* y resistentes a sacarosa eran mutantes por recombinación doble. Los mutantes así obtenidos fueron analizados por PCR, empleando dos parejas de cebadores que dan lugar a fragmentos de diferente tamaño en función de que se trate de la cepa mutada o no: por un lado se empleó la pareja formada por el oligonucleótido UP\_F (UP5995\_F o UP5918\_F) y el oligonucleótido reverso de cada gen (5995\_R o 5918\_R), y por otro lado la pareja formada por el oligonucleótido directo de cada gen (5995\_F o 5918\_F) y el DOWN\_R (DOWN5995\_R o DOWN5918\_R). Las cepas que presentaban los genes *MSMEG\_5995* y *MSMEG\_5918* delecionados se denominaron  $\Delta$ Cyp125 y  $\Delta$ Cyp142.

Para la construcción de la cepa doble mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142, el mutante simple  $\Delta$ Cyp125 fue transformado con el plásmido pJQUD5918 y los transformantes fueron seleccionados de la misma manera que se ha comentado para los mutantes simples.

## 5. Técnicas de manipulación de RNA

---

### 5.1. Extracción de RNA de micobacterias

El RNA para el análisis de la expresión génica en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se extrajo a partir de cultivos en medio mínimo con glicerol (18 mM), colesterol (1.8 mM) o ácido palmítico (3 mM) como fuente de carbono. En primer lugar 15 ml de cultivo en fase exponencial (DO<sub>600</sub> 0.6-0.8) se añadieron a 35 ml de solución de tiocianato de guanidinio (tiocianato de guanidinio 5 M, sarkosyl 0.5 %, citrato sódico 25 mM) para interrumpir la transcripción. El cultivo se centrifugó 10 min a 4000 g a 4 °C y las células se conservaron a -80 °C hasta su uso. Las células recogidas se resuspendieron en 200  $\mu$ l de agua. Este volumen se transfirió a tubos de rosca de 2 ml a los que se había añadido

previamente bolas de vidrio de XX  $\mu\text{m}$  de diámetro (Sigma). A esta suspensión se añadieron 700  $\mu\text{l}$  de solución RLT (Qiagen). Las bacterias se lisaron utilizando un Fast-Prep FP129 (Savant) durante 40 segundos a intensidad 6.5 y los extractos solubles se recuperaron mediante centrifugación durante 5 min a 13000 g a 4 °C. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada cultivo, usando un total de 30 ml de cada uno. En este punto, los extractos solubles de los duplicados se recogieron en un mismo tubo y el RNA se purificó utilizando el Rneasy kit (Qiagen) según las especificaciones del fabricante. Durante el proceso de purificación se realizó una digestión en columna con DNasa (Quiagen). Las muestras se eluyeron en 30  $\mu\text{l}$  de agua. Para eliminar el DNA residual se realizó un segundo tratamiento con DNasa en solución empleando el *DNase and Removal treatment kit* (Ambion), siguiendo las especificaciones del fabricante. La cantidad de RNA extraído se midió utilizando un NanoPhotometer®Pearl (Implen, GmbH). Las muestras de RNA se conservaron a -80 °C.

### 5.2. Retrotranscripción seguida de PCR (RT-PCR)

Una vez purificado el RNA y eliminado el DNA contaminante, se obtuvo el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción mediada por la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). Cada reacción de retrotranscripción (20  $\mu\text{l}$ ) contenía 1  $\mu\text{g}$  de RNA, 200 U de transcriptasa reversa, ditioneitol (DTT) 10 mM, dNTPs 0.5 mM y 5 mM de *pd(N)<sub>6</sub> random hexamer 5' phosphate* (Amersham Biosciences). Los hexámeros se emplearon como cebadores para poder emplear las mismas alícuotas de cDNA como molde para reacciones de PCR en los que se emplean diversos pares de oligonucleótidos. En primer lugar el RNA y los hexámeros se incubaron a 65 °C durante 5 min para permitir la hibridación de los mismos y tras enfriar en hielo se añadieron los restantes componentes de la reacción, que se incubó a 42 °C durante 2 h. La reacción se finalizó con una incubación de 15 min a 70 °C. De forma paralela se realizaron controles sin retrotranscriptasa (RT-) para cada una de las muestras. El cDNA obtenido se empleó como molde para la PCR posterior. El cDNA se

amplificó utilizando los oligonucleótidos requeridos en cada caso a concentración final 0.5  $\mu$ M y 1 U de la DNA polimerasa I (Biotools). El objetivo de esta PCR es el de comprobar por un lado, que las reacciones de retrotranscripción han funcionado correctamente, y por otro, corroborar la ausencia de DNA contaminante en las muestras de RNA gracias a las reacciones de PCR realizadas con el producto de las reacciones RT-.

### 5.3. PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para analizar los niveles de transcripción de diferentes genes se realizaron experimentos de PCR en tiempo real en un *iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad). Se amplificaron fragmentos de alrededor de 100 pb de cada uno de los genes de interés. Las reacciones se realizaron por triplicado empleando diluciones  $\frac{1}{5}$  y  $\frac{1}{50}$  de cDNA, 0.2 mM final de cada cebador y 12.5  $\mu$ l de SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en 25  $\mu$ l de volumen final. Las parejas de cebadores utilizadas se muestran en la Tabla 3. Cada ciclo de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, un segundo paso a la temperatura de fusión específica para cada pareja de oligonucleótidos durante 30 s y por último una etapa de elongación a 72 °C durante 30 s. Se realizaron 40 ciclos. La cantidad relativa de RNAm para cada gen se determinó siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) usando los niveles del RNAm del gen *sigA* (*MSMEG\_2758*) como control interno. Los datos que se muestran son la media de tres experimentos independientes. La obtención y el análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el iQ5 Optical System Software (Versión 2.0) (Bio-Rad).

## **6. Técnicas de manipulación de proteínas**

---

### **6.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)**

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), en geles de poliacrilammida (PAGE), a una concentración del 10 % o del 12.5 % según la técnica descrita previamente (Laemmli, 1970). Las muestras se hirvieron durante 10 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 250 mM a pH 6.8, SDS 2 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.05 %). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente, empleando un electrolito de composición: Tris-HCl 25 mM pH 8.0, glicina 192 mM y SDS 0.1%. Las proteínas fueron teñidas con Coomassie Brilliant Blue R250, según se describe previamente (Swank y Munkres, 1971).

Las proteínas empleadas como marcadores de tamaño molecular (miosina, 200 kDa;  $\beta$ -galactosidasa, 116.2 kDa; fosforilasa B, 97.4 kDa; BSA, 66.2 kDa; ovoalbúmina, 45.0 kDa; anhidrasa carbónica, 31.0 kDa; inhibidor de tripsina, 21.5 kDa; lisozima, 14.4 kDa; aprotinina, 6.5 kDa) fueron proporcionadas por Bio-Rad (marcadores Broad-Range).

### **6.2. Obtención de extractos protéicos de *M. smegmatis***

Para obtener extractos de *M. smegmatis* se utilizó un sonicador Branson 150. Un volumen de los cultivos correspondientes se centrifugó, se lavó 2 veces con solución salina (NaCl 0.9% en H<sub>2</sub>O destilada) y se resuspendió en 500  $\mu$ l de tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5. Las muestras se sonicaron enfriadas en hielo aplicando 6-8 pulsos de 1 min a intensidad 9 del equipo. Entre pulsos se incubaron los tubos 30 s en hielo. Después se centrifugaron durante 15 min a 14000 g a 4 °C y se separó la fracción celular soluble de la insoluble. La concentración total de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

### 6.3. Sobreproducción y purificación de los citocromos P450 CYP125 y CYP142

Los genes *MSMEG\_5995* (CYP125A3) y *MSMEG\_5918* (CYP142A2) fueron amplificados mediante PCR usando la DNA polimerasa Pfu Turbo (New England Biolabs), los cebadores indicados en la Tabla 3 y DNA genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 como molde. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *NdeI-HindIII* y se clonaron en el vector de pCWori+ (Tabla 2) (Barnes *et al.*, 1991) resultando los plásmidos pCW125<sub>SM</sub> pCW142<sub>SM</sub>. Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los plásmidos pCW125<sub>SM</sub> pCW142<sub>SM</sub> se cultivaron en medio TB en presencia de 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ampicilina a 37 ° C y 250 rpm hasta una DO<sub>600</sub> de 0.7-0.8. En este momento se indujo la expresión de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 mediante la adición de 1 mM de IPTG y 0.5 mM de ácido  $\delta$ -aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) y se mantuvo el cultivo durante 36 h a 25 ° C y 180 rpm. Los cultivos se recogieron por centrifugación (30 min, 5000 g, 4 ° C) y las células se congelaron a -80 ° C hasta su uso. La biomasa procedente de 4 l de cultivo se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 400 ml de tampón A (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 0.5 M de NaCl, 0.1 mM de EDTA, 20 mM de imidazol) y 1 mM PMSF. La suspensión de células se incubó durante 30 min en agitación a 4 ° C tras la adición de 0.5 mg ml<sup>-1</sup> de lisozima y 0.1 mg ml<sup>-1</sup> de DNasa. Las células se rompieron por sonicación utilizando un sonicador Branson aplicando 6 pulsos de 1 min al 80% de potencia. Entre cada pulso la suspensión de células se incubó durante 30 s en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 100000 g durante 45 min a 4 ° C. Las proteínas se purificaron mediante un paso de cromatografía de afinidad en columnas de níquel seguida de dos pasos de cromatografía de intercambio iónico. En primer lugar el extracto soluble se cargó en una columna de níquel-nitrilotriacetato en gel de sílice (Ni-NTA) previamente equilibrada con tampón A. La columna se lavó con 400 ml de tampón B (Tris-HCl 50 pH 7.5, 0.1 mM de EDTA y 20 mM de imidazol) y las proteínas se eluyeron con 200 ml de tampón C (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 0.1 mM de EDTA y 250 mM de imidazol). A continuación, todas las fracciones eluidas de la columna de Ni-NTA se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico empleando dos columnas colocadas en tándem: una columna de SP-

*Sepharose Fast-Flow* (Amersham Biosciences) y posteriormente una columna de *Q-Sepharose Fast-Flow* (Amersham Biosciences), ambas equilibradas con tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Después de lavar la segunda columna con 500 ml del mismo tampón, las proteínas se eluyeron con 200 ml de 50 mM de Tris-HCl pH 7.5 que contenía 500 mM de NaCl. Todas las fracciones eluidas que contenían los citocromos P450 purificados se juntaron, concentraron y dializaron en tampón Tris HCl 50 mM pH 7.5 con EDTA 0.1 mM. La concentración de las proteínas puras se determinó espectroscópicamente a partir de la absorbancia a 450 nm de los complejos proteína-CO y empleando el coeficiente de extinción molar de  $91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Omura and Sato, 1964). Las proteínas purificadas se conservaron a  $-20^\circ \text{C}$ .

### 6.4. Sobreproducción y purificación de la proteína KstR

La cepa recombinante de *E. coli* BL21 (DE3) que porta el plásmido pET6042 (Tabla 2), construido previamente (Uhía *et al.*, 2011), se utilizó para sobreproducir la proteína KstR. La cepa recombinante se cultivó en medio LB en presencia de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  de kanamicina a  $37^\circ \text{C}$  y 250 rpm hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0.6. En este momento la expresión de KstR se indujo mediante la adición de  $200 \mu\text{M}$  IPTG y el cultivo se mantuvo durante 3 h a  $37^\circ \text{C}$ . Las células se recogieron por centrifugación (15 min, 5000 g,  $4^\circ \text{C}$ ) y se congelaron a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su uso. La biomasa correspondiente a 1 l de cultivo se descongeló en hielo y se resuspendió en 5 ml de tampón HEPES 20 mM pH 8.0, 0.5 M de KCl y 1 % de Triton X-100. Las células se rompieron por sonicación utilizando un sonicador Branson aplicando 4 pulsos de 1 min al 80% de potencia, con 30 s de enfriamiento en hielo entre cada pulso. Tras la ruptura de las células se añadió sulfato de estreptomicina al 2 % (p/v) para facilitar la precipitación del DNA y se agitó hasta su completa disolución. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 100000 g durante 45 min a  $4^\circ \text{C}$  y las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel *HisTrap FF crude* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón HEPES 20 mM pH 8.0, 0.5 M de KCl que contenía 5 mM de imidazol. Todos los pasos de purificación se llevaron a cabo a  $4^\circ \text{C}$  y empleando este mismo tampón pero

con concentraciones crecientes de imidazol. A continuación se realizó un primer lavado de 100 ml con 5 mM de imidazol y un segundo lavado de 100 ml con 50 mM de imidazol. La proteína se eluyó con 50 ml de tampón conteniendo 150 mM de imidazol y la columna se lavó con 50 ml de 500 mM de imidazol para asegurar la elución completa de la proteína. La pureza de cada una de las fracciones se analizó mediante PAGE-SDS. Las fracciones que contenían la proteína KstR se concentraron utilizando filtros Amicon® (Millipore) y se dializaron en tampón HEPES 20 mM pH 8.0, 5 M de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de β-mercaptoetanol. La concentración de la proteína KstR pura se midió empleando un NanoPhotometer® Pearl. Implen, GmbH (Munich, Alemania) o un -espectrofotómetro 1240 UVmini (Shimadzu) utilizando el coeficiente de extinción molar a 280 nm de 18.450 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína el servidor ExPASy (<http://expasy.org/>). La proteína purificada conservó a 4 °C para su uso inmediato o a -20 °C con un 10 % de glicerol para periodos más largos.

#### 6.5. Técnica de *Western blot*

El análisis de la expresión de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 en la cepa silvestre y las diferentes cepas mutantes (ΔCyp125, ΔCyp142 y ΔCyp125ΔCyp142) se mediante *Western blot*. En primer lugar se sometieron a electroforesis (PAGE-SDS al 12.5 %) los extractos proteicos de cada una de las cepas (40 μg) y las proteínas purificadas (20 ng). A continuación, las proteínas separadas electroforéticamente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook and Russell, 2001). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) y BSA 5 % en tampón PBS (fosfato sódico 10 mM pH 7.4, conteniendo NaCl 140 mM) mediante incubación a temperatura ambiente durante 12 h. Tras 3 lavados de 15 min con PBS que contenía Tween 20 al 0.1 % (v/v), la membrana se incubó durante 1 h a 4 °C con agitación suave en presencia de una dilución 1/10000 de los anticuerpos anti-CYP125 o anti-CYP142 de *M. tuberculosis* (cedidos por el prof. P. Ortiz de Montellano, UCSF, San Francisco, California, EE.UU.). Ambos anticuerpos se incubaron previamente con el extracto proteico del mutante ΔCyp125ΔCyp142 (proporción 1:1) durante 12 h a 4 °C en



agitación orbital para evitar la interacción de los anticuerpos con proteínas inespecíficas. Posteriormente, se repitieron los tres lavados con PBS-Tween y la membrana se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y agitación suave en presencia de una dilución 1/10000 de anticuerpos ECLTM *Anti-rabbit* IgG (GE Healthcare). Finalmente, tras tres lavados con PBS-Tween, las bandas se revelaron con el sistema ECLTM *Western Blotting Detection* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **7. Ensayos enzimáticos de actividad monooxigenasa**

---

Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de vidrio a temperatura ambiente en un volumen de 0.15 ml. Las soluciones stock de colesterol y 4-colesten-3-ona se prepararon a una concentración de 10 mM en una solución de  $\text{DMSO}$  al 10 % (p/v) preparada en PBS. Los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 (0.5  $\mu\text{M}$ ) se incubaron durante 5 min con cada uno de los sustratos en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7.5) que contenía 0,45% (w/v) de  $\text{DMSO}$ , 150 mM de NaCl y 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 0.3 mM de NADPH, 1 mM ferredoxina de espinaca (Sigma), 0.2 U  $\text{ml}^{-1}$  de ferredoxina-NADP<sup>+</sup> reductasa de espinaca (Sigma), 0.1 mg  $\text{ml}^{-1}$  de catalasa bovina y un sistema regenerador de NADPH consistente en 0.4 U  $\text{ml}^{-1}$  de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 5 mM de glucosa-6-fosfato. Para cada tiempo de reacción (0, 5 y 20 min) se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  que se inactivaron mediante la adición de 150  $\mu\text{l}$  de ácido fórmico al 0.1 % que contenía 10  $\mu\text{M}$  de 1,4-colestadien-3-ona como control interno. Las muestras se centrifugaron a 10000 g durante 4 min y los sobrenadantes se analizaron mediante HPLC (ver apartado 9.1).

Para determinar los valores de  $K_m$ , los datos se ajustaron a la ecuación cuadrática utilizando el programa GraphPad (Prism). En la Ecuación 1,  $K_{\text{obs}}$  es la tasa de formación de producto a cada concentración de sustrato;  $K_{\text{max}}$  es la tasa de formación de producto máxima;  $K_m$  es la concentración de sustrato a la que se consigue la mitad

de la tasa de producción máxima; [Et] es la concentración de enzima total utilizada; [S] es la concentración de sustrato.

Ecuación 1.

$$K_{obs} = K_{max} \left[ \frac{([S] + [E] + K_m) - \left( ([S] + [E] + K_m)^2 - (4[S][E]) \right)^{0.5}}{2[Et]} \right]$$

## 8. Ensayos de unión DNA-proteína

---

### 8.1. Marcaje de sondas con $^{32}\text{P}$

Mediante este método se prepararon las sondas de DNA 5228FP y PQ3. Para ello, en primer lugar se realizó el marcaje de los oligonucleótidos 5' correspondientes en cada caso (Tabla 3). Para la reacción de marcaje se emplearon 2.5  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido (2  $\mu\text{M}$ ), 1.25  $\mu\text{l}$  de tampón kinasa 10x (Biolabs), 3  $\mu\text{l}$  de [  $^{32}\text{P}$ ]ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia Biotech) y 10 U de T4 polinucleótido kinasa (Biolabs) en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$ . La mezcla de reacción se incubó 30 min a 37 °C. Al término de la incubación se comprobó el nivel de incorporación del nucleótido radiactivo al oligonucleótido mediante una cromatografía en capa fina (TLC). Para ello se depositaron 0.5  $\mu\text{l}$  de la sonda marcada sobre una membrana de sílica gel 60 (Merck) utilizando HCl 1 N como fase móvil. A continuación se realizó una autorradiografía empleando una película Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech). Una vez marcado el oligonucleótido de interés marcado radiactivamente, se obtuvo mediante PCR los fragmentos correspondientes a las sondas 5228 FP y PQ3 utilizando los oligonucleótidos correspondientes en cada caso (Tabla 3) y empleando como molde 100 ng de DNA de *M. smegmatis* para la primera y 10 ng del plásmido pJCDPQ3 para la segunda. En este caso la reacción de PCR difiere de la descrita en el apartado 4.4 de esta sección. Se añadieron 10  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido marcado (5 pmoles), 7.5  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido no marcado a 1  $\mu\text{M}$  (7.5 pmoles), 4  $\mu\text{l}$  de dNTPs a 2.5 mM (0.2 mM

final), 5 µl de tampón Taq polimerasa 10x, 1 µl de Taq polimerasa, 1 µl de DNA molde en un volumen final de 50 µl. A continuación el producto amplificado se purificó con el sistema High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) y se eluyó en un volumen final de 100 µl.

### 8.2. Ensayos de retardo en gel

Para realizar los ensayos de retardo en gel, las sondas marcadas tal y como se ha descrito en el apartado anterior se incubaron con diferentes concentraciones de la proteína KstR previamente purificada. La reacción de incubación se llevó a cabo en 20 mM de Tris-HCl a pH 8, 150 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10% de glicerol, 2 mM de β-mercaptoetanol y 50 mg ml<sup>-1</sup> BSA en un volumen final de 9 µl. En los ensayos de competición se empleó un exceso de sonda no marcada radiactivamente (40,400 y 4000 veces) o un exceso de DNA inespecífico de esperma de salmón (0,5, 1 y 2 µg). Para estudiar la interacción entre la proteína KstR y las dos sondas de DNA en presencia de los posibles inductores, éstos se disolvieron en metanol y se incubaron con la proteína KstR durante 10 min a temperatura ambiente. Tras la adición de la sonda de DNA las mezclas de reacción se incubaron durante 10 min más y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel no desnaturizante de poliacrilamida al 5%. Los geles se corrieron en cubetas de electroforesis "Miniprotean II" (Bio-Rad) a 125 V en tampón TBE (Tris-borato 45 mM pH 8.3 y EDTA 1 mM) a temperatura ambiente. Los geles se secaron al vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech).

La cuantificación de las bandas de retardo se realizó con el programa Multi Gauge V 3.0 (FUJIFILM). La constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para la unión de la proteína KstR a la sonda 5228FP se estimó empleando los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la intensidad de la banda correspondiente al complejo KstR-5228FP. En el caso de los experimentos con los posibles inductores, la  $K_d$  se calculó utilizando

los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la intensidad de la banda correspondiente a la sonda desplazada por el inductor.

Los ensayos de retardo en gel realizados con las sondas 5228FP y PQ3 y la proteína RNA polimerasa de *E. coli* (USB), se realizaron de la misma manera que se ha comentado para los retardos con la proteína KstR pero empleando el tampón 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10% glicerol, 2mM de b-mercaptoetanol, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> y 50 mg ml<sup>-1</sup> BSA.

### 8.3. Ensayos de transcripción *in vitro*

Todas las soluciones se prepararon con agua destilada que contenía el inhibidor de RNasa dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma) y fueron filtradas antes de su uso. El tampón utilizado para la reacción contenía 50 mM de Tris-HCl a pH 7.5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 100 mM de KCl, al que se añadió 1 mM de DTT y 500 µg ml<sup>-1</sup> de BSA. El volumen final de reacción fue de 20 µl y contenía 1 nM de DNA plásmido pJCDPH3 (o pJCD01 para reacciones de control) (Tabla 2), 40 nM de RNA polimerasa holoenzima de *E. coli* (USB), 1 mM de ATP, 1 mM de GTP, 1 mM CTP, 0.1 mM de UTP (todos ellos de Roche), 2.5 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP (3000 Ci / mmol) (Perkin Elmer) y la proteína KstR a la concentración establecida en cada caso. En primer lugar se incubó la proteína KstR y el DNA plasmídico durante 5 min a 37 °C. Para probar el efecto de los inductores en la reacción de transcripción, éstos se disolvieron en metanol y se incubaron con la proteína KstR durante 10 min a temperatura ambiente antes de la adición del DNA. Tras la incubación con el DNA se añadió la mezcla de reacción que contenía la RNA polimerasa, los nucleótidos no marcados y el  $\alpha$  -<sup>32</sup>P] UTP y se incubó durante 5 min a 37 °C para que tuviera lugar la reacción de elongación. Ésta se paró con 10 µl de una solución que contenía formamida al 96 % (v/v), EDTA 20 mM pH 8, azul de bromofenol y azul de xilencianol. Las muestras se calentaron a 70 °C antes de cargar 7 µl de las mismas en un gel desnaturante de poliacrilamida al 4 % que contenía 8 M de urea. La electroforesis se desarrolló en tampón TBE 0.5x a 300 V. Los geles se secaron al

vacío sobre papel Whatman 3MM y se expusieron en películas Hyperfilm™ MP (Amersham Pharmacia Biotech). La cuantificación de las bandas correspondientes a los transcritos se realizó mediante el programa Multi Gauge V 3.0 (FUJIFILM).

## **9. Técnicas cromatográficas**

---

### **9.1. Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)**

La cuantificación de las cantidades relativas de los productos generados en las reacciones de monooxigenación llevadas a cabo con los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 se realizó mediante HPLC usando un sistema HPLC Serie 1200 de Agilent y una columna de fase reversa C18. Las muestras se eluyeron isocráticamente a un flujo de  $0.5 \text{ ml min}^{-1}$  (disolvente A,  $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$  de ácido fórmico; disolvente B,  $\text{CH}_3\text{CN} + \text{ácido fórmico}$  al  $0.1\%$ ) comenzando con un 70 % de B durante 1 min e incrementando el disolvente hasta 100% de B durante 12 min. La elución se mantuvo a 100 % de B durante 14 minutos y luego se redujo de nuevo a 70% de B en 1 min, seguido del equilibrado de la columna durante 2 min antes de la siguiente muestra. La elución se monitorizó a 240 nm..

### **9.2. Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS)**

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS) se utilizó para analizar la transformación de 4-colesten-3-ona en cultivos de diversas cepas de *M. smegmatis*. El equipo empleado consistió en un equipo de cromatografía líquida (Surveyor Plus LC) equipada con inyector automático acoplado a una trampa iónica (LXQ) equipada con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), todo ello suministrado por Thermo Electron (San Jose, CA, EE. UU.). Los datos se procesaron con el software Xcalibur (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EE.UU.).

La separación cromatográfica se realizó en una columna Tracer Excel 120 ODSB C18 (150 mm × 4.6 mm de diámetro interno, 5 µm de tamaño de partícula) (Teknokroma, Barcelona, Spain). La fase móvil empleada contenía acetonitrilo/agua (90/10, v/v) y acetonitrilo/isopropanol (85/15, v/v) como fases A y B respectivamente. El flujo empleado fue de 1 ml min<sup>-1</sup> y el gradiente lineal utilizado fue el siguiente: 100 % de A durante 5 min, incrementado a 100 % de B en 35 min. Tras mantener 100 % de B durante 7 min se reestablecieron las condiciones iniciales, reequilibrándose la columna durante 8 min. Durante este gradiente, el eluyente pasó al espectrómetro de masas desde el minuto 2 hasta el 45.

La optimización de los parámetros en el espectrómetro de masas se realizó a partir de soluciones madre de patrones de colesterol (Sigma) y 4-colesten-3-ona (Fluka) en MβCD a una concentración inicial de 6.8 mM y 7 mM respectivamente, inyectados en la trampa iónica mediante infusión directa con una velocidad de flujo de 5 µL min<sup>-1</sup>. Así, el valor de los distintos parámetros que permiten una mayor sensibilidad de detección son los siguientes: temperatura del capilar 275 °C, temperatura de vaporización 425 °C, voltaje del capilar 39 V, voltaje de descarga de la corona 6.00 kV, corriente de la fuente 6.00 µA y 15 eV para la energía de disociación por colisión. Como gas auxiliar y nebulizador se utilizó nitrógeno de alta pureza.

El análisis cuantitativo se realizó por el método del patrón interno, a partir de diluciones de la solución madre de colesterol y 4-colesten-3-ona en agua destilada, en concentraciones comprendidas entre 34 µM y 1.52 mM para el colesterol, y 70 µM y 0.875 para la 4-colesten-3-ona, a las que se añadió 50 µL de 5-pregnen-3β-ol-20-ona como patrón interno a una concentración de 20 mg ml<sup>-1</sup>. La extracción de analitos se llevó a cabo de la misma manera que en las muestras a analizar. Los residuos concentrados de las muestras se resuspendieron en 400 µL de acetonitrilo (Scharlau) de los que se inyectaron 25 µL para su análisis cromatográfico.

## **10. Dicroísmo circular (CD)**

---

Las medidas de dicroísmo se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un controlador de temperatura de tipo Peltier. En los ensayos se utilizó una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico en la que se introdujo 0.2 ml de muestra. Todas las medidas de CD se realizaron en tampón fosfato potásico con 150 mM de KCl. La concentración de proteína KstR empleada para la adquisición de los espectros de CD en el UV lejano fue de 3  $\mu$ M. Estos experimentos se realizaron a 20 °C y se tomaron cinco medidas consecutivas a partir de las cuales se obtuvo un espectro medio. Los valores de elipticidad observados se convirtieron en valores de elipticidad media por residuo  $[\theta]$  teniendo en cuenta que la masa molecular media por residuo es de 110.5 Da. Los ensayos de desnaturalización térmica se llevaron a cabo utilizando una concentración de proteína de 4  $\mu$ M y en este caso, las muestras se recubrieron con un aceite mineral. Se determinó la señal de CD a 222 nm mientras aumentaba la temperatura desde 20 °C hasta 80 °C a una velocidad de calentamiento de 20 °C/h. A partir de los datos obtenidos se estimó la temperatura media de desnaturalización de la proteína ( $T_m$ ). El análisis de la composición de la estructura secundaria de las proteínas nativas se realizó usando el programa CDNN con un conjunto de datos de referencia 33 proteínas, tal como se aplica en el programa (Böhm *et al.*, 1992).

## **11. Ultracentrifugación analítica**

---

Los experimentos de velocidad de sedimentación se llevaron a cabo en una ultracentrífuga analítica modelo Optima XL-A (Beckman) equipada con un espectrofotómetro UV-visible y con un rotor An50Ti con celdas de doble sector de cuarzo. Los experimentos se realizaron con 1 mg ml<sup>-1</sup> de KstR en tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7.5 que contiene 150 mM de KCl. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó mediante el programa SEDFIT (Schuck, 2000; Dam and Schuck, 2005).

## **12.Cristalización de las proteínas Cyp125A3 y Cyp142A2**

---

La cristalización de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis* se realizó en el laboratorio de la Prof. Larissa M. Podust en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de California en San Francisco (UCSF).

Antes de la cristalización, las proteínas CYP125A3 CYP142A2 y se diluyeron hasta 0.2 mM en tampón 10 mM de Tris-HCl pH 7.5. Las condiciones de cristalización en cada caso se determinaron utilizando kits comerciales de cribado de alto rendimiento (Hampton Research) y un robot *Nanolitre drop-setting Mosquito* (TTP LabTech). Todos los cristales se sumergieron en 20-25% de etilenglicol antes de su congelación en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recogieron en el Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley (EE.UU). Las estructuras cristalinas se determinaron inicialmente por reemplazo molecular utilizando las estructuras de los citocromos CYP125A1 (PDB ID 2x5W) y CYP142A1 (PDB ID 2XKR) de *M. tuberculosis* como modelos de búsqueda.

## **13.Análisis bioinformáticos**

---

Los análisis de secuencias de DNA y proteínas se realizaron utilizando el paquete de programas DNASTAR y los programas y bases de datos detallados a continuación. El análisis y búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* fue realizado utilizando el servidor *Comprehensive Microbial Resource* (CMR) (Craig Venter's Institute) (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>) y el servidor *Tuberculist* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Para la búsqueda de secuencias nucleotídicas y proteicas de *Rhodococcus jostii* RHA1 se utilizaron las herramientas disponibles en el sitio *Rhodococcus Genome Project* (<http://www.rhodococcus.ca/>). Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos fueron comparadas con las existentes en



## Materiales y Métodos

las bases de datos mediante el uso de los algoritmos BLASTN y BLASTP, respectivamente a través del servidor del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgibin/Entrez/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgibin/Entrez/genom_table.cgi)), a través del servidor CMR o el sitio *Rhodococcus Genome Project*. Los alineamientos múltiples de proteínas se llevaron a cabo con el programa CLUSTALW2(Thompson *et al.*, 1994) alojado en el servidor EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Las masas moleculares teóricas de las proteínas se calcularon con el programa Compute pI/Mw del servidor ExPASy ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)). Las predicciones de estructura secundaria y tridimensional se realizaron con el programa LOOPP alojado en el servidor BioHPC (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/loopp.aspx>) y la visualización de los distintos modelos y los análisis posteriores se realizaron con el programa PyMol (DeLano, 2002). La búsqueda de dominios conservados en secuencias proteicas se llevó a cabo utilizando la base de datos PROSITE alojada en el servidor ExPASy (<http://www.expasy.ch/prosite/>).

## **V. RESULTADOS**



## **1. Caracterización de los citocromos P450 que catalizan el primer paso de degradación de la cadena lateral del colesterol en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155**

---

Como se ha comentado ampliamente en el capítulo de Introducción, una de las primeras reacciones bioquímicas indispensables para la degradación del colesterol consiste en la oxidación de éste a 5-colesten-3-ona y la posterior isomerización a colesteno. Estas reacciones son catalizadas por colesterol oxidasas o por 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas (3- $\beta$ -HSD). En *M. smegmatis* estos primeros pasos de oxidación son realizados por las enzimas 3- $\beta$ -HSD y SDRm (deshidrogenasa de cadena corta) codificadas por los genes *MSMEG\_5228* y *MSMEG\_5233* respectivamente. (Uhía, 2010; Uhía *et al.*, 2011). A continuación, o también previo a este paso, tiene lugar la degradación de la cadena lateral. Durante el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral surgieron varios trabajos en los que se describía que los citocromos P450 CYP125 y CYP142 eran responsables del primer paso en la degradación de la cadena lateral del colesterol tanto en *M. tuberculosis* (Capyk *et al.*, 2009; McLean *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010) como en *R. jostii* RHA1 (Rosłonec *et al.*, 2009). La identificación y caracterización de los citocromos P450 responsables de los primeros pasos de la degradación de la cadena lateral del colesterol en *M. smegmatis* ha sido abordada en esta Tesis Doctoral con el objetivo de determinar las diferencias existentes entre esta cepa de crecimiento rápido y de vida fundamentalmente libre en el medio ambiente y la cepa patógena de vida intracelular y de crecimiento lento *M. tuberculosis*.

### **1.1. Identificación de los citocromos P450 implicados en la degradación de colesterol en *M. smegmatis***

Previamente al inicio de esta Tesis Doctoral se habían llevado a cabo en el laboratorio experimentos de *microarrays* que permitieron identificar los genes de *M. smegmatis* que presentaban una inducción diferencial en colesterol frente a glicerol

## Resultados

(Uhía, 2010; Uhía *et al.*, 2012). De los 89 genes identificados, 59 parecen implicados directamente en el metabolismo, regulación o transporte del colesterol, y la mayoría de ellos se encuentran agrupados en dos grandes *clusters*. Sin embargo, algunos de ellos se localizan fuera de esas agrupaciones génicas.

De entre todos los genes que se inducen cuando la bacteria crece en colesterol como única fuente de carbono, se identificaron tres genes, *MSMEG\_5995*, *MSMEG\_5918* y *MSMEG\_4829*, que codifican citocromos P450. El gen *MSMEG\_5995* es el que presenta una mayor inducción de todos los genes identificados en los experimentos de *microrrays* (66 veces de inducción en colesterol frente glicerol). Los otros dos genes, *MSMEG\_5918* y *MSMEG\_4829*, no presentan una inducción tan elevada como éste (5 y 11 veces, respectivamente). Tanto *MSMEG\_5995* como *MSMEG\_5918* parecen estar regulados negativamente por el represor KstR, ya que en un mutante  $\Delta$ KstR ambos genes aparecen inducidos en ausencia de colesterol y además presentan el motivo de unión del represor en su región promotora-operadora (Kendall *et al.*, 2007). Por el contrario, el gen *MSMEG\_4829* no está regulado por KstR ni KstR2, ya que no se han encontrado en su región promotora los motivos de unión a estos represores, por lo que hasta la fecha se desconoce si este citocromo está implicado directamente en la degradación de colesterol.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se decidió centrar el estudio en las proteínas codificadas por los genes *MSMEG\_5995* y *MSMEG\_5918*. En primer lugar se realizaron análisis bioinformáticos de las dos proteínas. La proteína codificada por el gen *MSMEG\_5995* presenta un 77% de identidad de secuencia con el citocromo CYP125A1 de *M. tuberculosis* (codificado por el gen *Rv3545c*) y un 78 % de identidad con el citocromo CYP125A14P de *R. jostii* RHA1 (codificado por el gen *ro04679*). El gen *MSMEG\_5995* se localiza dentro del operón formado por los genes *MSMEG\_5900-5995*, que se representa en la figura 5B. Las proteínas codificadas en este operón presentan una elevada identidad (77-84%) (Tabla 4) con las codificadas en el operón *igr* (*Rv3545c-3540c*) de *M. tuberculosis*. Este operón ha sido descrito como esencial para la supervivencia en los procesos de infección de este patógeno e indispensable para el

metabolismo del colesterol (Chang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009). Las proteínas codificadas por los genes *MSMEG\_5994* y *MSMEG\_5993* presentan una elevada identidad con las proteínas FadE28 (*Rv3544c*) y FadE29 (*Rv3543c*) de *M. tuberculosis*, que recientemente han sido renombradas como ChsE1 y ChsE2 y que constituyen un complejo heterotetramérico con actividad acil-CoA deshidrogenasa, implicado en el último ciclo de  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral del colesterol (Thomas and Sampson, 2013). Por su parte, las proteínas codificadas por los genes *MSMEG\_5992* y *MSMEG\_5991* presentan una elevada identidad con las proteínas codificadas por los genes *Rv3542c* y *Rv3541c*, anotadas como dos enoil-CoA hidratatasas que han sido propuestas como responsables de la reacción de hidratación que tiene lugar tras la actuación de las enzimas ChsE1 y ChsE2 comentadas anteriormente (Thomas *et al.*, 2011). Finalmente, el gen *MSMEG\_5990* codifica una proteína homóloga a la codificada por el gen *Rv3540c*, anotada como una proteína transportadora de lípidos Lpt2. En posición divergente al gen *MSMEG\_5995* se encuentra localizado el gen *MSMEG\_5996*, que codifica una proteína que presenta una identidad del 76% con la proteína FadA5 de *M. tuberculosis* (*Rv3546*), identificada como una  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa responsable del último paso de la degradación de la cadena lateral del colesterol e indispensable para la formación de AD, que constituye el primer metabolito de la ruta de degradación del colesterol que carece de cadena lateral (Nesbitt *et al.*, 2010).

Tanto los genes que forman parte del operón *igr* como el gen que codifica la tiolasa FadA5 en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, tienen su ortólogo en *R. jostii* RHA1 (Tabla 4), pero la organización de éstos en el genoma de esta bacteria es diferente. El gen que codifica el citocromo CYP125 en RHA1 (*ro04679*) se encuentra fuera del operón *igr*, junto al gen que codifica la tiolasa FadA5 (*ro4678*) (Fig. 5C).

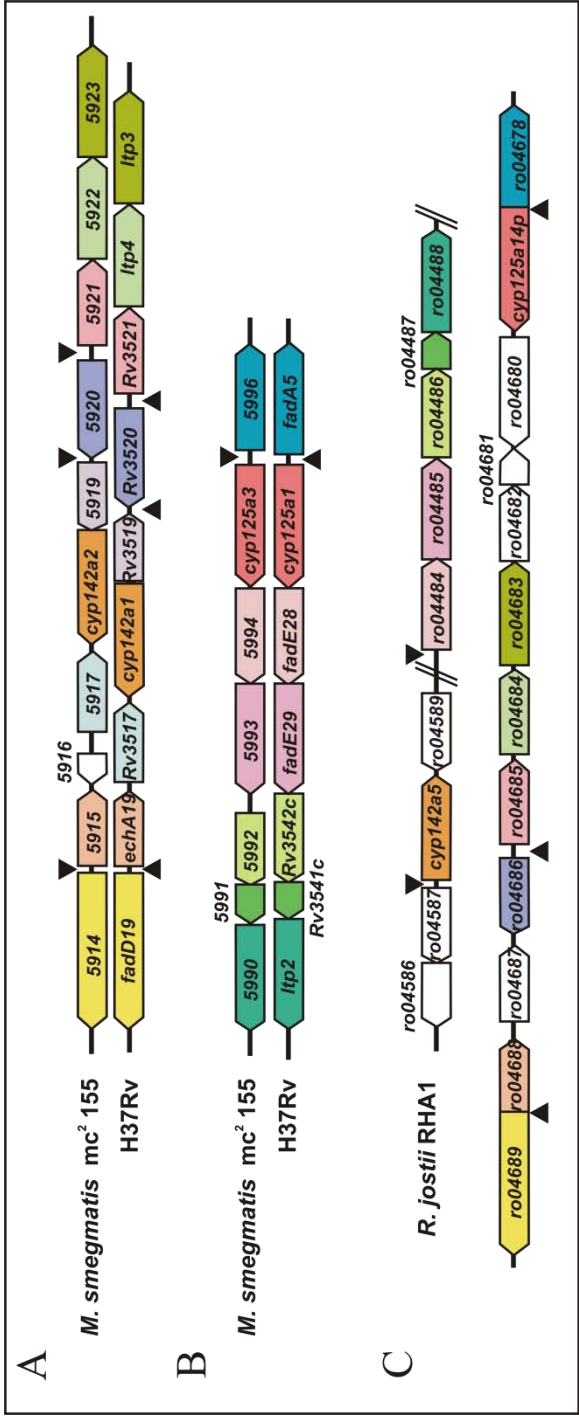


Figura 5. Representación esquemática de las regiones génicas donde se encuentran localizados los genes que codifican citocromos CYP125 y CYP142 en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, *M. tuberculosis* H37Rv y *R. jostii* RHA1. (A) Alineamiento de las regiones génicas donde se localizan los genes que codifican los citocromos CYP142 en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y *M. tuberculosis* H37Rv. (B) Alineamiento de las regiones génicas donde se localizan los genes que codifican los citocromos CYP125 en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y *M. tuberculosis* H37Rv. (C) Disposición en el genoma de *R. jostii* RHA1 de los genes ortólogos a los incluidos en las regiones representadas en (A) y (B). Los genes ortólogos se representan con el mismo código de color. Los triángulos negros indican la posición de las cajas operadoras de KstR.

<i>M. smegmatis</i>	MTB	% ID	Nombre	Anotación	RHA1	% ID
<i>MSMEG_5914</i>	<i>Rv3515c</i>	83	FadD19	Acil-CoA sintetasa	<i>ro04689</i>	68
<i>MSMEG_5915</i>	<i>Rv3516</i>	82	EchA19	Enoil-CoA hidratasa	<i>ro04688</i>	74
<i>MSMEG_5916</i>	----	----	----	----	----	----
<i>MSMEG_5917</i>	<i>Rv3517</i>	59	----	Proteína hipotética	----	----
<i>MSMEG_5918</i>	<i>Rv3518c</i>	78	CYP142A1	Citocromo P450 monooxigenasa 142	<i>ro04588</i>	61
<i>MSMEG_5919</i>	<i>Rv3519</i>	66	----	Proteína hipotética	----	----
<i>MSMEG_5920</i>	<i>Rv3520</i>	85	----	Oxidoreductasa dependiente de Coenzima F420	<i>ro04686</i>	72
<i>MSMEG_5921</i>	<i>Rv3521</i>	76	----	Proteína hipotética	<i>ro04685</i>	61
<i>MSMEG_5922</i>	<i>Rv3522</i>	80	Ltp4	Proteína transportadora de lípidos	<i>ro04684</i>	74
<i>MSMEG_5923</i>	<i>Rv3523</i>	87	Ltp3	Acetil-CoA acetiltransferasa	<i>ro04683</i>	81
<i>MSMEG_5990</i>	<i>Rv3540c</i>	84	Ltp2	Proteína transportadora de lípidos	<i>ro04488</i>	77
<i>MSMEG_5991</i>	<i>Rv3541c</i>	76	----	Enoil-CoA hidratasa	<i>ro04487</i>	69
<i>MSMEG_5992</i>	<i>Rv3542c</i>	74	----	Enoil-CoA hidratasa	<i>ro04486</i>	62
<i>MSMEG_5993</i>	<i>Rv3543c</i>	77	FadE29	Acil-CoA deshidrogenasa	<i>ro04485</i>	69
<i>MSMEG_5994</i>	<i>Rv3544c</i>	73	FadE28	Acil-CoA deshidrogenasa	<i>ro04484</i>	45
<i>MSMEG_5995</i>	<i>Rv3545c</i>	77	CYP125A1	Citocromo P450 125	<i>ro04679</i>	78
<i>MSMEG_5996</i>	<i>Rv3546</i>	84	FadA5	Acetil-CoA acetiltransferasa	<i>ro04678</i>	76

**Tabla 4. Análisis bioinformático de las proteínas codificadas en las regiones génicas que contienen los genes *MSMEG\_5995* y *MSMEG\_5918*.** En la tabla se muestran los genes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y su porcentaje de identidad (% ID) con los ortólogos en *M. tuberculosis* H37Rv (MTB) y *R. jostii* RHA1 (RHA1) obtenido mediante Blastp. El nombre y anotación de las proteínas aparece tal y como se describe para *M. tuberculosis*.

El gen *MSMEG\_5918* se localiza en otra región del genoma de *M. smegmatis* distinta al operón *igr* (Fig. 5A). Este gen codifica una proteína que presenta una identidad del 78% con el citocromo CYP142A1 de *M. tuberculosis* (*Rv3518c*) (Tabla 4). Dicha región génica está muy conservada en las dos especies, a excepción del gen *MSMEG\_5916* (Fig. 5A). No se ha encontrado ninguna proteína homóloga a ésta en las bases de datos, lo que indica que lo más probable es que realmente se trate de un error en la anotación de los marcos abiertos de lectura. Las proteínas que se encuentran codificadas en esta región génica también presentan una elevada identidad con las



## Resultados

proteínas de la región equivalente en *M. tuberculosis* (59-87%) (Tabla 4). Se trata de una acil-CoA sintetasa (FadD19/ *Rv3515c*/ *MSMEG\_5914*), una enoil-CoA hidratasa (EchA19/ *Rv3516*/ *MSMEG\_5915*), tres proteínas hipotéticas (*Rv3517*/ *MSMEG\_5918*, *Rv3519*/ *MSMEG\_5919* y *Rv3521*/ *MSMEG\_5921*), una oxidoreductasa dependiente de F420 (*Rv35420*/ *MSMEG\_5920*), una proteína transportadora de lípidos (Ltp4/ *Rv3522*/ *MSMEG\_5922*) y una acil-CoA acetiltransferasa (Ltp3/ *Rv3523*/ *MSMEG\_5923*). La única diferencia en la organización de estos genes es la dirección de la transcripción del gen *MSMEG\_5919*, que es opuesta a la de su ortólogo en *M. tuberculosis* (*Rv3519*) (Fig. 5A). Esto podría suponer alguna variación en la expresión del gen del citocromo CYP142 en *M. smegmatis*, ya que se encuentra formando un operón con el gen *MSMEG\_5919* y por tanto su expresión estaría mediada por el promotor de éste que tiene una caja operadora para la unión del regulador KstR (Fig. 5A).

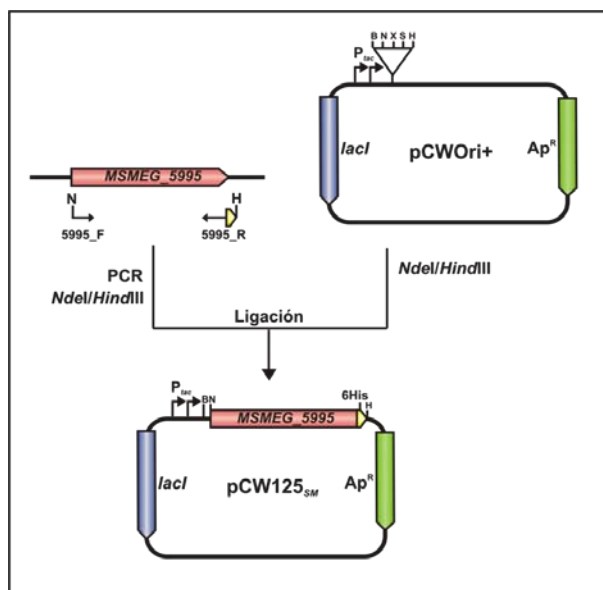
En *R. jostii* RHA1 el citocromo CYP142 está codificado por el gen *ro04588* y presenta una identidad de secuencia del 61% con el citocromo CYP142 de *M. smegmatis*. A diferencia de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, este gen se encuentra en una región aislada del genoma de *R. jostii* RHA1 (Fig. 5C). El resto de proteínas codificadas en la misma región génica que el citocromo CYP142 en *M. smegmatis*, excepto las correspondientes a los genes *MSMEG\_5917* y *MSMEG\_5919*, están también presentes en el genoma de *R. jostii* RHA1, y presentan una identidad de secuencia entre el 61 y el 81% (Tabla 4). Estas proteínas se encuentran agrupadas de la misma manera que lo están en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, pero en una región próxima a los genes *cyp125* y *fadA5*.

Una vez identificados en *M. smegmatis* los genes que codifican los citocromos CYP125 y CYP142, se procedió a realizar la caracterización biofísica, bioquímica y estructural de cada uno de ellos. De aquí en adelante se empleará la nomenclatura de CYP125A3 y CYP142A2 propuesta por David R. Nelson (Nelson, 2009) (<http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>).

## 1.2. Caracterización biofísica y bioquímica y del citocromo P450 CYP125A3 de *M. smegmatis*

### 1.2.1. Clonación, expresión heteróloga y purificación de CYP125A3

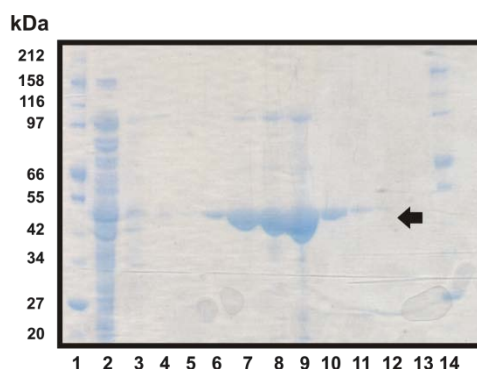
El gen *MSMEG\_5995*, que codifica el citocromo CYP125A3, se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 5995\_F y 5995\_R (Tabla 3 de la sección Materiales y Métodos). Para facilitar la purificación de la proteína, en el oligonucleótido 5995\_R se incluyeron 18 nucleótidos correspondientes a un *tag* de 6 histidinas que quedan fusionadas al extremo carboxilo-terminal de la proteína y permiten su purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. El producto de PCR digerido con las enzimas *NdeI/HindIII* se ligó con el vector pCWori+ (Barnes *et al.*, 1991) previamente digerido con las mismas enzimas. (Fig. 6). Este plásmido contiene además el gen de  $\beta$ -lactamasa (resistencia a ampicilina, Ap<sup>R</sup>) y la secuencia del represor LacI, que permite el control de la expresión del gen clonado mediante la adición de IPTG. El plásmido resultante pCW125<sub>SM</sub> contenía el gen *MSMEG\_5995* bajo la inducción de dos promotores *Ptac* colocados en tándem.



## Resultados

**Figura 6. Construcción del plásmido pCW125<sub>SM</sub>.** El plásmido pCW0ri+ presenta el gen de resistencia a ampicilina (representado como una flecha verde) y el gen que codifica el represor LacI (representado por una flecha azul). El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción. Las dos copias del promotor *P<sub>tac</sub>* colocadas en tándem se indican mediante flechas negras. En el esquema se muestran las enzimas más relevantes del sitio múltiple de clonación (B: *Bam*HI; N: *Nde*I; X: *Xba*I; S: *Sal*I; H: *Hind*III). El gen *MSMEG\_5995* se representa mediante una flecha roja. Los oligonucleótidos 5995\_F y 5995\_R fueron los empleados para la amplificación del gen *MSMEG\_5995*. En amarillo se representa la secuencia de 6 histidinas incluidas en el oligonucleótido 5995\_R.

La purificación de la proteína CYP125A3 se llevó a cabo a partir de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pCW125<sub>SM</sub> cultivadas en medio TB e inducidas en presencia de IPTG y ácido aminolevulínico, que constituye un precursor del grupo hemo. Una vez inducidas, las células se recuperaron mediante centrifugación y se obtuvo un extracto proteico a partir del cual se purificó la proteína mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel seguida de dos pasos de cromatografía de intercambio iónico (apartado 6.3. de la sección Materiales y Métodos). Como se muestra en la figura 7, la proteína CYP125A3, con un peso estimado de 47 kDa, se purificó a homogeneidad electroforética. La concentración de la proteína pura se estimó mediante el estudio espectroscópico de los complejos proteína-CO, que se detalla en el siguiente apartado.



**Figura 7. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación del citocromo CYP125A3 mediante cromatografía de afinidad.** Calles 1 y 14, marcadores de peso molecular (se indica en el margen izquierdo el tamaño en kDa correspondiente a cada banda); calle 2, fracción proteica no retenida en la columna; calle 3, lavado con 20 mM de imidazol; calles 4-13, diferentes fracciones eluidas con 250 mM de imidazol. La flecha indica la posición del citocromo CYP125A3 purificado.

## 1.2.2. Caracterización espectroscópica del citocromo CYP125A3

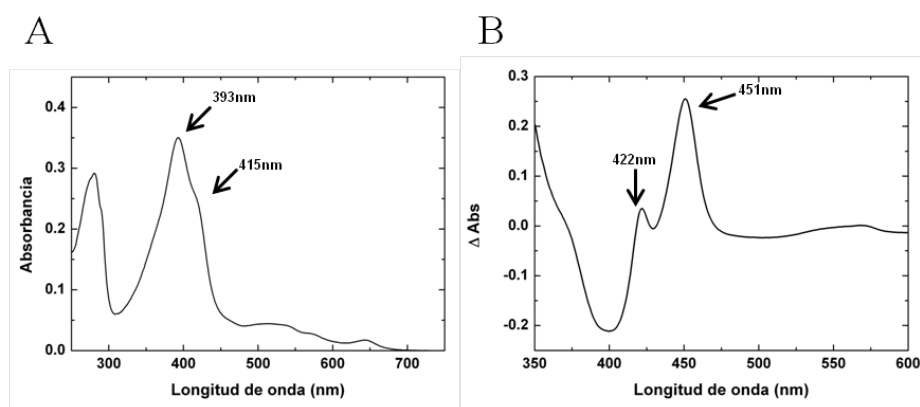
### 1.2.2.1. Propiedades espectroscópicas del citocromo CYP125A3

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, los citocromos P450 presentan unas propiedades espectroscópicas características debido a la presencia del grupo hemo, las cuales permiten estimar la concentración de proteína purificada activa. Por un lado, el átomo de hierro del grupo hemo puede encontrarse en estado de bajo espín o alto espín dependiendo de si se encuentra hexacoordinado (con la sexta posición de coordinación ocupada por una molécula de agua) o pentacoordinado (con la sexta posición de coordinación libre) respectivamente. En función del estado en el que se encuentre, presentará un espectro de absorción en el UV-visible característico. El espectro de absorción en el UV-visible del citocromo CYP125A3 muestra la existencia de un máximo de absorción o banda Soret a 393 nm (Fig. 8A), lo que indica que el  $\text{Fe}^{3+}$  del grupo hemo se encuentra mayoritariamente en un estado de alto espín. La presencia de un pequeño hombro a 415 nm, indica que una pequeña proporción de la proteína se encuentra en estado de bajo espín.

Por otro lado, otra de las características de los citocromos P450 es la formación de complejos entre el hierro en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el CO, lo que produce una transición de la banda de Soret a 450 nm. La formación de estos complejos en el caso del citocromo CYP125A3 se indujo mediante la adición de ditionito sódico (que actúa como agente reductor) sobre una muestra de la proteína saturada en CO. En la figura 8B se muestra la diferencia entre el espectro de la proteína tras la formación de los complejos  $\text{Fe}^{2+}$ -CO y el espectro de la proteína en su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). El resultado es la aparición de un máximo de absorción a 451 nm, así como un máximo secundario a

## Resultados

422 nm que indica que una pequeña proporción de la proteína se encuentra inactiva (McLean *et al.*, 2006). El cálculo de la concentración de la proteína a partir del valor de absorbancia a 451 nm y empleando el coeficiente de extinción molar de  $91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Omura and Sato, 1964), permitió estimar que el rendimiento en la producción y purificación del citocromo CYP125A3 fue de 35 mg de proteína por litro de cultivo.



**Figura 8. Caracterización espectroscópica de la proteína CYP125A3. (A)** Espectro de absorción en el UV-visible. **(B)** Espectro de absorción resultante de la sustracción del espectro de la proteína en estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) al espectro de la proteína tras la formación de los complejos  $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ .

### 1.2.2.2. Estudios de unión a ligandos del CYP125A3 mediante espectroscopia

Los citocromos P450 responden a la unión de los ligandos con cambios en el estado electrónico del hierro del grupo hemo, que se corresponde con transiciones de la banda de Soret hacia el rojo o hacia el azul. Estas transiciones son causadas normalmente por el desplazamiento de la molécula de agua que ocupa la sexta posición de coordinación del átomo de hierro, lo que se conoce como transición de tipo I, o bien por la coordinación del hierro con un átomo de nitrógeno presente en la molécula, ya sea alifática o aromática, que accede al centro activo, lo que se conoce transiciones de tipo II (Schenkman *et al.*, 1967). Los cambios en el espectro de absorción asociados a

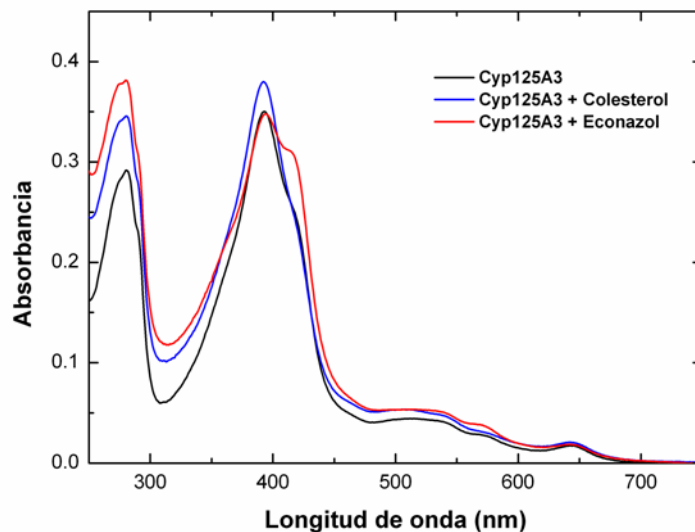
estas transiciones se caracterizan por un máximo a 385-395 nm en el caso de las transiciones de tipo I, y un máximo a 425-436 nm en las transiciones de tipo II.

Las moléculas que producen transiciones de tipo I suelen ser sustratos de los citocromos P450, y normalmente se trata de moléculas hidrofóbicas. Por otro lado, las moléculas que originan transiciones de tipo II actúan como inhibidores y se caracterizan por presentar un átomo de nitrógeno con un par de electrones desapareados. El átomo de nitrógeno de estos compuestos interacciona con el hierro ocupando la sexta posición de coordinación de éste, lo que mantiene al grupo hemo en su estado de bajo espín impidiendo la captación de electrones necesaria para el progreso del ciclo catalítico de la proteína.

Con el propósito de determinar si el citocromo CYP125A3 de *M. smegmatis* constituía el ortólogo en esta cepa de los citocromos P450 CYP125 caracterizados previamente en *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1, se analizó en primer lugar su espectro de absorción en presencia de colesterol y econazol (Fig. 9), descritos como sustrato e inhibidor de estas proteínas, respectivamente. Dada la elevada hidrofobicidad de estos compuestos y su baja solubilidad en agua, el colesterol se disolvió en metil- $\beta$ -ciclodextrina y el econazol en metanol (ver apartado 2.3. de Materiales y métodos). En la figura 9 se muestran los espectros de absorción en el UV-visible del citocromo CYP125A3 en estado estacionario (color negro), y en presencia de 50  $\mu$ M de colesterol (color azul) y 50  $\mu$ M de econazol (color rojo). La adición de colesterol produce un incremento del máximo de absorción a 393 nm y una reducción del hombro a 415 nm (transición de tipo I) como resultado de la completa conversión del grupo hemo al estado de alto espín, lo que indica que, como se había descrito para el citocromo CYP125 de *M. tuberculosis* (McLean *et al.*, 2009; Ouellet *et al.*, 2010) y *R. jostii* RHA1 (Rosłonec *et al.*, 2009), el colesterol es un sustrato del CYP125A3 de *M. smegmatis*. Por el contrario, la adición de econazol causa un incremento considerable de la absorción a 415 nm como resultado de la conversión parcial del grupo hemo al estado de bajo espín (transición de tipo II) producido por la coordinación del átomo de nitrógeno del econazol con el hierro. Esto confirma que el econazol actúa como un inhibidor del

## Resultados

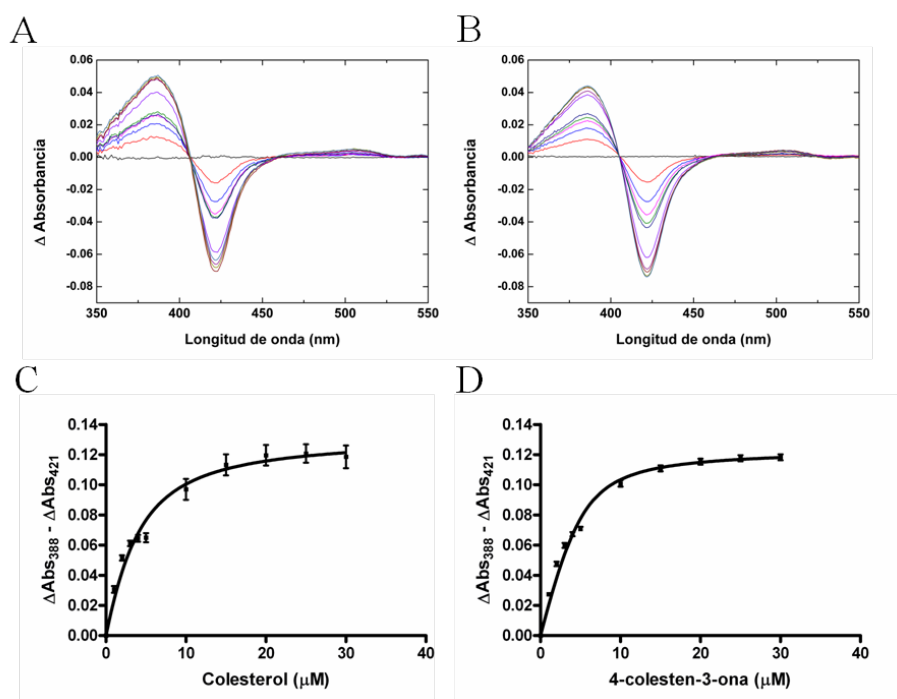
citocromo CYP125A3 igual que en el caso del CYP125A1 de *M. tuberculosis* (McLean *et al.*, 2009).



**Figura 9. Espectros de absorción en el UV-visible del citocromo CYP125A3.** Se representa el espectro de absorción de la proteína en su estado estacionario (línea negra), en presencia de 50  $\mu$ M de colesterol (línea azul) y 50  $\mu$ M de econazol (línea roja).

Una vez comprobado que el colesterol se une específicamente al citocromo CYP125A3 produciendo cambios en su espectro de absorción, se realizaron ensayos de unión a varios sustratos empleando diferentes concentraciones de los mismos. Además del colesterol, se analizó también el efecto de la colestenoína, que constituye el primer intermediario de la ruta de degradación tras la actuación de las actividades colesterol oxidasa o 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, y que ya se había demostrado previamente que interaccionaba con los citocromos de *M. tuberculosis* y *R. jostii* RHA1 (Rosłonec *et al.*, 2009; Ouellet *et al.*, 2010). Tanto el colesterol como la colestenoína se disolvieron en 10% v/v de metil- $\beta$ -ciclodextrina, quedando a una concentración final en el ensayo menor de 0.1% v/v. En la figura 10 se muestran las

diferencias en el espectro de absorción entre la proteína libre y la proteína unida a diferentes concentraciones de colesterol (Fig. 10A) o colesteno (Fig. 10B). Como puede observarse en ambos casos, la presencia del sustrato, incluso a la concentración más baja ensayada (1  $\mu\text{M}$ , curva roja), ocasiona un aumento de la absorción a 388 nm y una disminución de la absorción a 421 nm con respecto a la proteína sin sustrato (curva negra), lo que se relaciona con la transición del estado de bajo espín a alto espín comentada anteriormente. Conforme se incrementa la concentración de sustrato (1-30  $\mu\text{M}$ ) las diferencias de absorción entre el máximo a 388 nm y el mínimo a 421 nm se acentúan. La representación gráfica de estas diferencias y el posterior ajuste de los datos (Fig. 10C y 10D) permitió estimar que las constantes de afinidad aparentes ( $K_d$ ) para el colesterol y la colesteno son  $1.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$  y  $2.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$  respectivamente. Estos resultados confirman que tanto el colesterol como la colesteno funcionan como sustratos del citocromo CYP125A3.

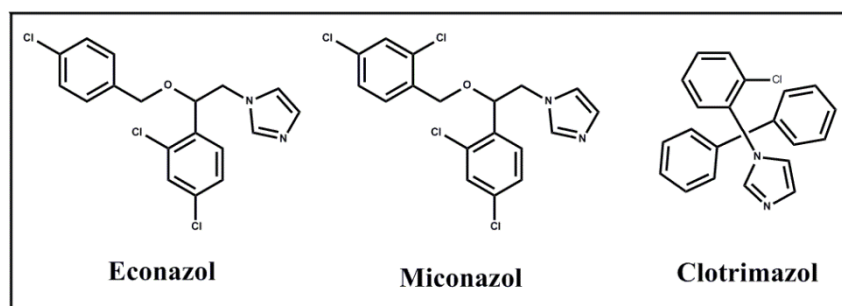




## Resultados

**Figura 10. Ensayos de unión a colesterol y colestenoona del citocromo CYP125A3.** (A y B) Espectros de absorción resultantes de la diferencia entre el espectro de absorción de la proteína unida a ligando y la proteína libre para cada concentración de colesterol (A) o colestenoona (B). Las concentraciones de sustratos probadas fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ . La línea negra corresponde a las diferencias en ausencia de sustrato y la roja a las diferencias cuando se añadió 1  $\mu\text{M}$  de sustrato. El resto corresponden sucesivamente a cada concentración creciente de sustrato. (C y D) Representación gráfica de las diferencias de absorbancia entre el máximo a 388 nm y el mínimo a 421 nm para cada concentración de colesterol (C) o colestenoona (D) probadas. El ajuste de los datos permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para cada sustrato.

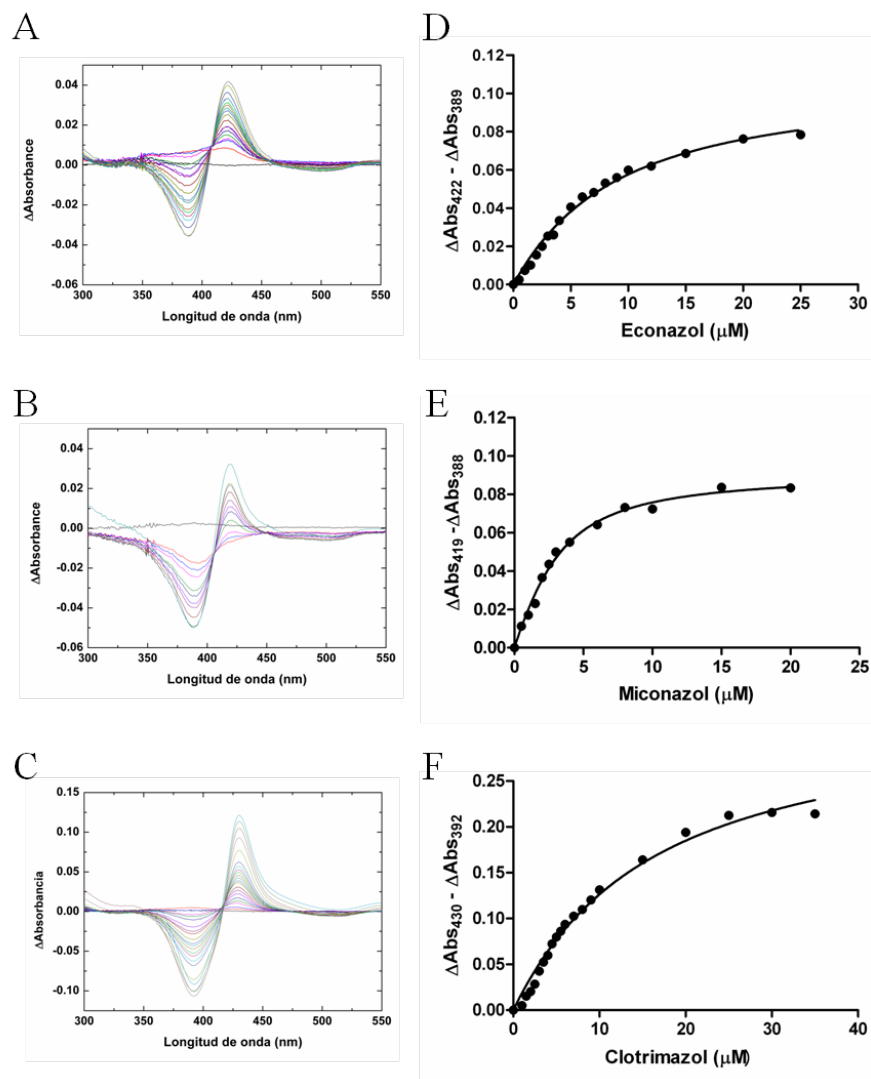
Como se mostró en la figura 9, el econazol actúa como un inhibidor del citocromo CYP125A3, produciendo una transición de tipo II de la banda de Soret. De la misma manera que se ha comentado para los sustratos colesterol y colestenoona, se realizaron ensayos de unión a diferentes azoles cuyo efecto inhibitor sobre el citocromo CYP125A1 de *M. tuberculosis* ya había sido comprobado (McLean *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011). Los azoles que se emplearon fueron econazol, miconazol y clotrimazol, cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 11. Todos estos compuestos se disolvieron en metanol manteniéndose la concentración de dicho disolvente por debajo de 1.5% v/v en el ensayo.



**Figura 11. Estructura química de los azoles empleados en los ensayos de unión a inhibidores.**

Las diferencias en el espectro de absorción entre la proteína libre y la unida a econazol, miconazol y clotrimazol se muestran en las figuras 12A, 12B y 12C respectivamente. La presencia de estos compuestos produce un incremento de la absorción en el rango 419-430 nm y una disminución de la absorción en torno a 390 nm que es donde el citocromo CYP125A3 presenta su máximo de absorción en estado estacionario. Esta variación en la absorción (transición de tipo II) confirma que todos ellos actúan como inhibidores del citocromo CYP125A3. Conforme se incrementa la concentración de inhibidor las diferencias de absorción entre el máximo en torno a 419-430 nm y el mínimo en torno a 390 nm se acentúan. La representación gráfica de estas diferencias y el posterior ajuste de los datos (Fig. 12D, 12E y 12F) permitió estimar que las constantes de afinidad aparentes ( $K_d$ ) para el econazol, miconazol y clotrimazol son  $7.38 \pm 0.71$ ,  $1.60 \pm 0.21$  y  $14.53 \pm 1.58$ , respectivamente.

## Resultados

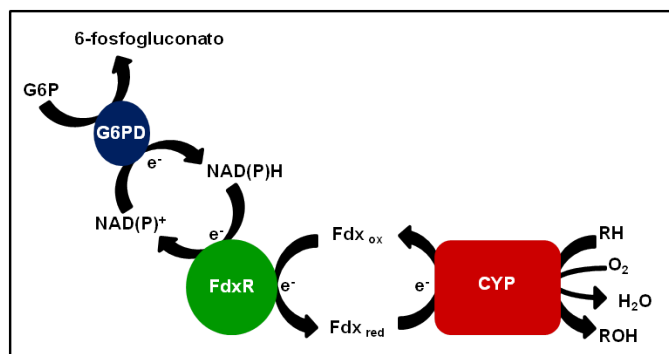


**Figura 12. Ensayos de unión del citocromo CYP125A3 a econazol, miconazol y clotrimazol.** (A-C) Espectros de absorción resultantes de la diferencia entre el espectro de absorción de la proteína unida a inhibidor y la proteína libre: econazol (A), miconazol (B) y clotrimazol (C). Las concentraciones de inhibidores probadas fueron: econazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20 y 25  $\mu$ M; miconazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 10, 15 y 20  $\mu$ M; clotrimazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu$ M. (E-F) representación gráfica de las diferencias de absorbancia entre el máximo

en torno a 419-430 nm y el mínimo en torno a 390 nm para cada concentración de econazol (**D**), miconazol (**E**) y clotrimazol (**F**) probadas. El ajuste de los datos permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para cada sustrato.

### 1.2.3. Ensayos de actividad monooxigenasa

Los citocromos P450 catalizan típicamente una reacción de monooxigenación de compuestos orgánicos a través del grupo hemo. Esta reacción de monooxigenación requiere la inserción de un átomo de oxígeno en el sustrato a partir del oxígeno molecular. Para que el hierro pueda unirse a una molécula de oxígeno es necesaria la captación de un par de electrones. Estos electrones son transferidos desde las proteínas redox que acompañan a los citocromos. En los citocromos P450 bacterianos, los electrones son transferidos desde el NAD(P)H a una ferredoxina reductasa (FdxR) la cual transfiere los electrones a una ferredoxina (Fdx) que los transporta directamente al citocromo (Fig. 13).



**Figura 13. Esquema de una reacción de monooxigenación típica de los citocromos P450.** Las flechas indican la transferencia de electrones entre los diferentes componentes del sistema. FdxR, ferredoxina reductasa; Fdx<sub>ox</sub>, ferredoxina oxidada; Fdx<sub>red</sub>, ferredoxina reducida; CYP, citocromo P450; RH, sustrato; ROH, producto hidroxilado. Se representa también el sistema regenerador de poder reductor que se emplea habitualmente en los ensayos enzimáticos, consistente en glucosa-6-fosfato (G6P) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD).

## Resultados

Para analizar *in vitro* la actividad enzimática del citocromo CYP125A3 se empleó como sistema de transporte de electrones la ferredoxina y la ferredoxina reductasa de espinaca (Sigma). Los ensayos se realizaron con diferentes concentraciones de colesteno disuelta en 0.05% de ciclodextrina y en presencia de un sistema regenerador de NADPH consistente en glucosa-6-fosfato y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Fig. 13). Las reacciones se iniciaron añadiendo a la mezcla de reacción el NADP<sup>+</sup>. Los productos generados tras 0, 5 y 20 min de incubación a cada concentración de sustrato fueron analizados mediante HPLC. El tiempo de retención (Rt) y los espectros de masas de los diferentes picos observados en los cromatogramas permitió la identificación de los productos generados, que correspondían a los derivados alcohol, aldehído y ácido en el C26 de la cadena lateral de la colesteno: 26-hidroxi-4-colesten-3-ona (Rt: 3.14 min, Masa: 401), 4-colesten-3-ona-26-al (Rt: 4.53 min, Masa: 399) y ácido 4-colesten-3-ona-26-oico (Rt: 2.15 min, Masa: 415) (Fig. 14). Hay que destacar que, en los tiempos de reacción probados, se detectaron muy pequeñas cantidades tanto del derivado aldehído como del derivado ácido.

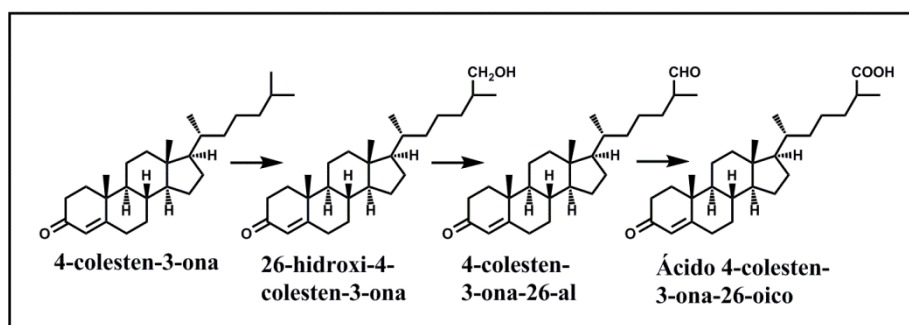
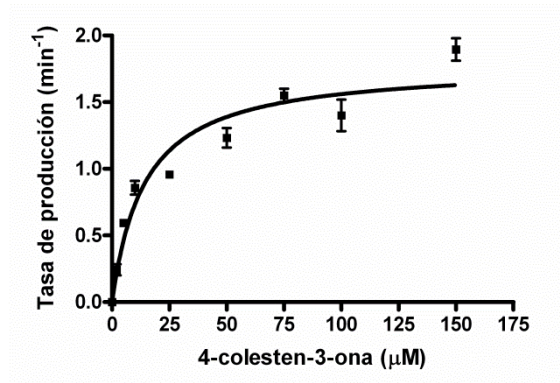


Figura C14. Productos derivados de la reacción del citocromo CYP125A3 a partir de colesteno

Dada la complejidad de la reacción debido a la producción de varios metabolitos intermediarios, se decidió estudiar los parámetros cinéticos de la proteína para la primera reacción de oxidación en la que se produce el derivado 26-hidroxi-4-

colestén-3-ona. Para ello la concentración de este compuesto fue estimada a partir de la integración de las áreas de los picos observados mediante HPLC. El cálculo de la velocidad de reacción y posterior ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (ver apartado 7 de la sección Materiales y Métodos) permitió la estimación de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $K_{cat}$  para el citocromo CYP125A3, que fueron de  $14.0 \pm 3.2 \mu\text{M}$  y  $1.8 \pm 0.1 \text{ min}^{-1}$  respectivamente (Fig. 15).



**Figura 15. Cinética enzimática del citocromo CYP125A3.** En la gráfica se representa la tasa de producción del intermediario 26-hidroxí-4-colestén-3-ona a las diferentes concentraciones de colestén-3-ona probadas (2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ). Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para calcular los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $K_{cat}$ .

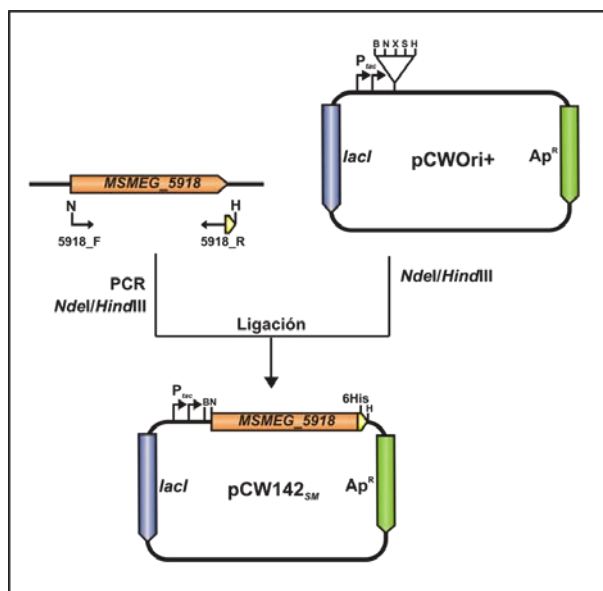
### 1.3. Caracterización biofísica y bioquímica del citocromo CYP142A2

#### 1.3.1. Clonación, expresión heteróloga y purificación de CYP142A2

El gen *MSMEG\_5918*, que codifica el citocromo CYP142A2, se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores 5918\_F y 5918\_R (Tabla 3 de la sección Materiales y Métodos). Al igual que en el caso del CYP125A3, en el oligonucleótido 5918\_R se incluyeron 18 nucleótidos correspondientes a un *tag* de 6 histidinas que quedan fusionadas al extremo carboxilo-terminal de la proteína y permiten su

## Resultados

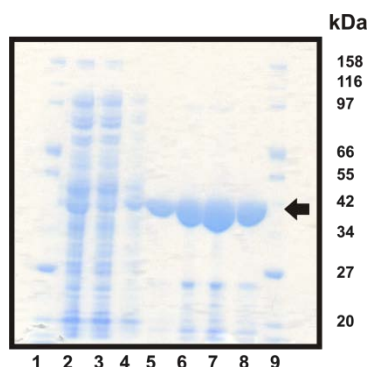
purificación mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel. La clonación se realizó en el plásmido pCWori+ de la misma manera que se comentó para el CYP125A3, obteniéndose el plásmido pCW142<sub>SM</sub> que contenía el gen *MSMEG\_5918* bajo la inducción de los dos promotores *Ptac* en tándem (Fig. 16).



**Figura 16. Construcción del plásmido pCW142<sub>SM</sub>.** El plásmido pCWori+ se representa de la misma manera que se indicó en la figura 6. El gen *MSMEG\_5918* se representa mediante una flecha naranja. Los oligonucleótidos 5918\_F y 5918\_R fueron los empleados para la amplificación del gen *MSMEG\_5918*. En amarillo se representa la secuencia de 6 histidinas incluidas en el oligonucleótido 5918\_R. B: *Bam*HI; N: *Nde*I; X: *Xba*I; S: *Sal*I; H: *Hind*III.

La purificación de la proteína CYP142A2 se llevó a cabo a partir de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con el plásmido pCW142<sub>SM</sub> de la misma manera que se comentó para la purificación del citocromo CYP125A3 (apartado 1.2.1. de esta sección). Como se muestra en la figura 17, la proteína CYP142A2, con un peso estimado de 45 kDa, se purificó a homogeneidad electroforética. La concentración de la proteína pura

se estimó mediante el estudio espectroscópico de los complejos proteína-CO, que se detalla en el siguiente apartado.



**Figura 17. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación del citocromo CYP142A2 mediante cromatografía de afinidad.** Calles 1 y 9, marcadores de peso molecular (se indica en el margen derecho el tamaño en kDa correspondiente a cada banda); calle 2, extracto proteico; calle 3, fracción proteica no retenida en la columna; calle 4, lavado con 20 mM de imidazol; calles 5-8, diferentes fracciones eluidas con 250 mM de imidazol. La flecha indica la posición del citocromo CYP142A2 purificado.

### 1.3.2. Caracterización espectroscópica del citocromo CYP142A2

#### 1.3.2.1. Propiedades espectroscópicas del citocromo CYP142A2

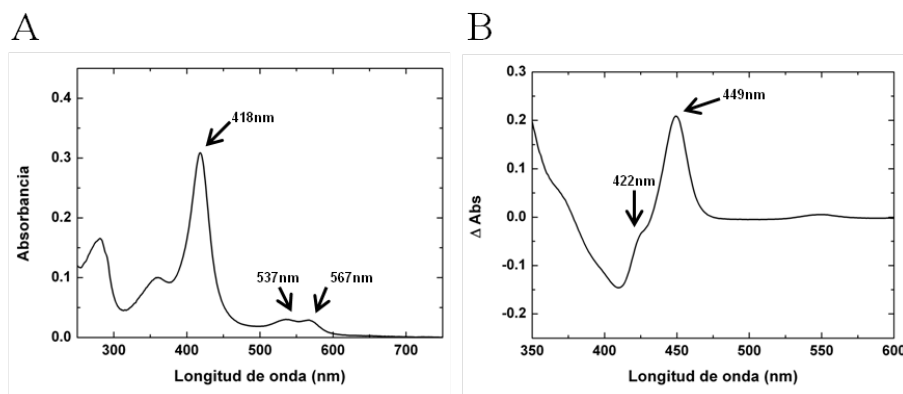
El análisis del espectro de absorción en el UV-visible del citocromo CYP142A2 reveló la existencia de máximo de absorción o banda Soret a 418 nm (Fig. 18A) y bandas  $\alpha$  y  $\beta$  a 567 y 536 nm respectivamente. El máximo de absorción a 418 nm indica que la totalidad del grupo hemo se encuentra en estado de bajo espín.

Al igual que en el caso del CYP125A3, también se analizó la formación de complejos entre el hierro en estado ferroso y el CO ( $\text{Fe}^{2+}$ -CO) en presencia de ditionito sódico como agente reductor. En la figura 18B se muestra la diferencia entre el espectro de la proteína tras la formación de los complejos  $\text{Fe}^{2+}$ -CO y el espectro de la proteína en su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). El resultado es la aparición de un máximo absorción a 449 nm,



## Resultados

así como un máximo secundario a 422 nm que indica que una ínfima proporción de la proteína se encuentra inactiva. A partir del valor de absorbancia a 449 nm, y empleando el coeficiente de extinción molar de  $91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Omura and Sato, 1964), se estimó la concentración de la proteína purificada y por tanto el rendimiento en la producción y purificación de la misma, que fue de 43 mg de proteína por litro de cultivo.

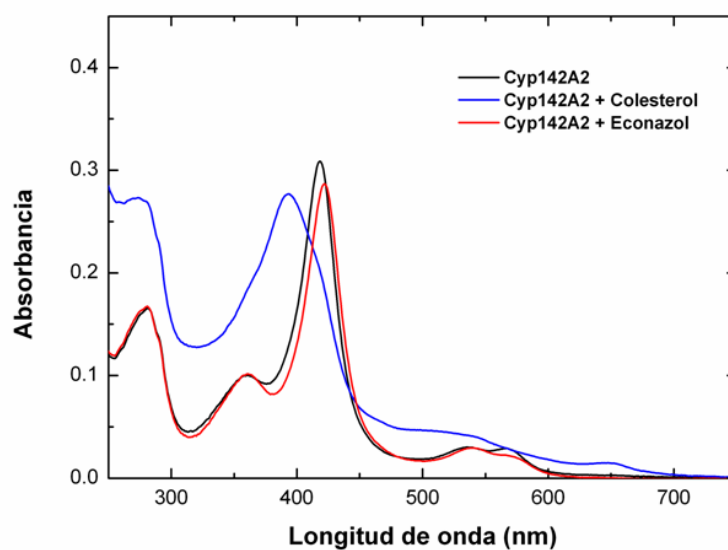


**Figura 18. Caracterización espectroscópica de la proteína CYP142A2.** (A) Espectro de absorción en el UV-visible. (B) Espectro de absorción resultante de la sustracción del espectro de la proteína en estado reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ) al espectro de la proteína tras la formación de los complejos  $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ .

### 1.3.2.2. Estudios de unión a ligandos del CYP142A2 mediante espectroscopía

Con el propósito de determinar si el citocromo CYP142A2 de *M. smegmatis* constituía el ortólogo en esta cepa del citocromo P450 CYP142A1 caracterizado previamente en *M. tuberculosis* (Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010), se analizó en primer lugar su espectro de absorción en presencia de colesterol y econazol. En la figura 19 se muestran los espectros de absorción en el UV-visible del citocromo CYP42A2 en estado estacionario (color negro), y en presencia de  $50 \mu\text{M}$  de colesterol (color azul) y  $50 \mu\text{M}$  de econazol. La adición de colesterol produce una transición completa al estado de alto espín (transición de tipo I), caracterizada por presentar un

máximo de absorción a 393 nm en lugar de a 418 nm como es típico de su estado estacionario, lo que indica que el colesterol es un sustrato del CYP142A2 de *M. smegmatis*, como se había descrito para el CYP142A1 de *M. tuberculosis* (Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010). Por el contrario, la adición de econazol causa un ligero desplazamiento del máximo de absorción a 422 nm (transición de tipo II), indicando que el econazol es un inhibidor del CYP142A2 de *M. smegmatis*, de la misma manera que ocurría con su ortólogo en *M. tuberculosis*.

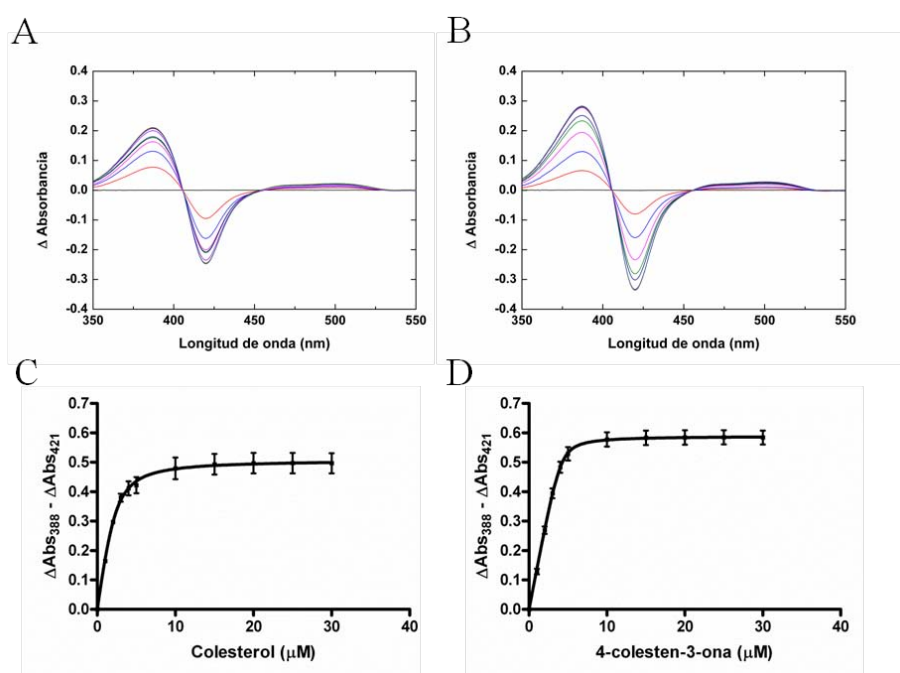


**Figura 19. Espectros de absorción en el UV-visible del citocromo CYP142A2.** Se representa el espectro de absorción de la proteína en su estado estacionario (línea negra), en presencia de 50 µM de colesterol (línea azul) y 50 µM de econazol (línea roja)

Tras comprobar que el colesterol interacciona con el citocromo CYP142A2 produciendo un efecto en su espectro de absorción típico de los sustratos, se realizaron ensayos de unión tanto a colesterol como a colestenoona de la misma manera que se describió en el caso del citocromo CYP125A3. En la figura 20 se muestran las

## Resultados

diferencias en el espectro de absorción entre la proteína libre y la unida a concentraciones crecientes de colesterol (Fig. 20A) o colestenona (Fig. 20B). Como puede observarse en ambos casos, la presencia del sustrato, incluso a la concentración más baja ensayada (1  $\mu\text{M}$ , curva roja), produce un aumento de la absorción a 388 nm y una disminución de la absorción a 421 nm con respecto a la proteína sin sustrato (curva negra), lo que se relaciona con la transición del estado de bajo espín a alto espín comentada anteriormente. Conforme se incrementa la concentración de sustrato (1-30  $\mu\text{M}$ ) las diferencias de absorción entre el máximo a 388 nm y el mínimo a 421 nm se acentúan. La representación gráfica de estas diferencias y el posterior ajuste de los datos (Fig. 20C y 20D) permitió estimar que la constante de afinidad aparente ( $K_d$ ) para el colesterol y la colestenona son  $0.14 \pm 0.07 \mu\text{M}$  y  $0.52 \pm 0.26 \mu\text{M}$  respectivamente. Estos resultados confirman que tanto el colesterol como la colestenona son sustratos del citocromo CYP142A2.

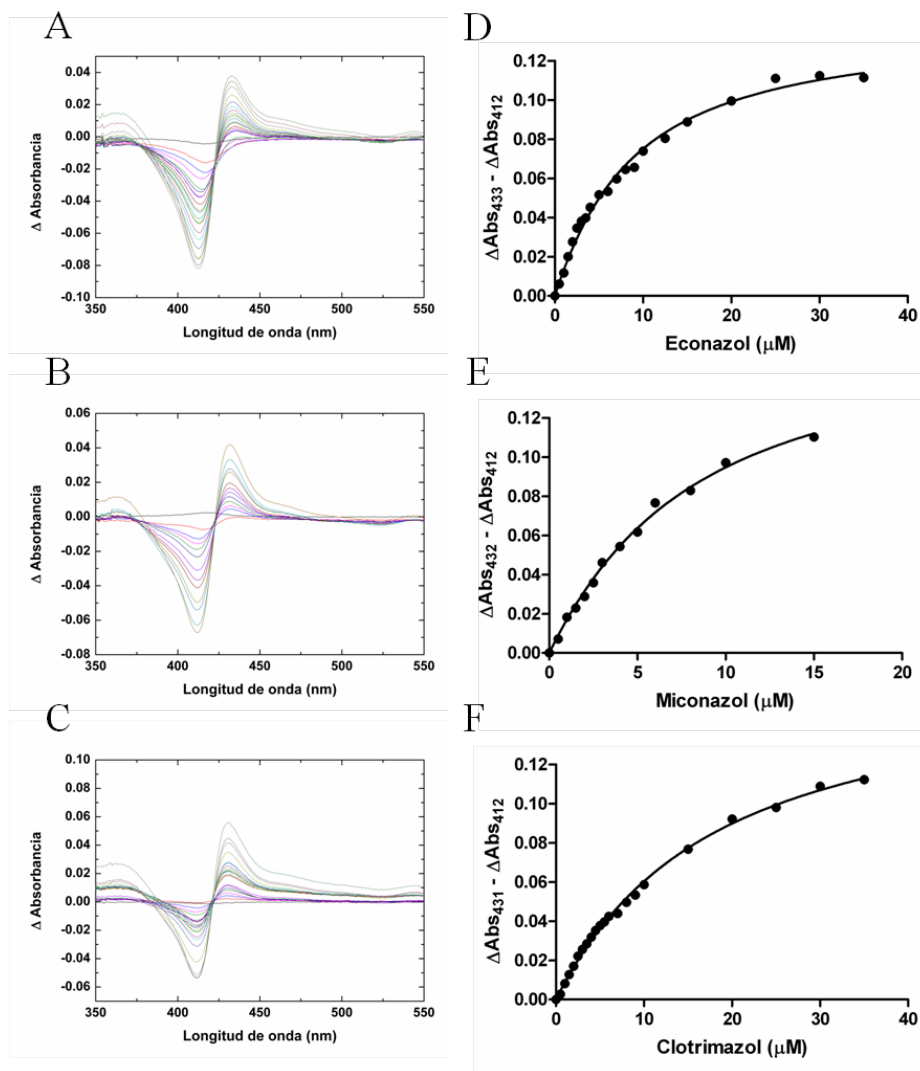


**Figura 20. Ensayos de unión a colesterol y colestenoona del citocromo CYP142A2. (A y B)** Espectros de absorción resultantes de la diferencia entre el espectro de absorción de la proteína unida a ligando y la proteína libre para cada concentración de colesterol (A) o colestenoona (B). Las concentraciones de sustratos probadas fueron: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ . La línea negra corresponde a las diferencias en ausencia de sustrato y la roja a las diferencias cuando se añadió 1  $\mu\text{M}$  de sustrato. El resto corresponden sucesivamente a cada concentración creciente de sustrato. (C y D) Representación gráfica de las diferencias de absorbancia entre el máximo a 388 nm y el mínimo a 421 nm para cada concentración de colesterol (C) o colestenoona (D) probadas. El ajuste de los datos permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para cada sustrato.

Como se mostró en la figura 19, el compuesto econazol produce un efecto en el espectro de absorción del citocromo CYP142A2 típico de los compuestos inhibidores de los citocromos P450, produciendo una transición de tipo II de la banda de Soret. De la misma manera que se comentó en el caso del citocromo CYP125A3, se realizaron ensayos de unión a econazol, miconazol y clotrimazol, cuyo efecto inhibidor sobre el citocromo CYP125A3 ha sido demostrado más arriba (Fig. 11).

Las diferencias en el espectro de absorción entre la proteína CYP142A2 libre y la unida a econazol, miconazol y clotrimazol se muestran en las figuras 21A, 21B y 21C respectivamente. La presencia de estos inhibidores produce un incremento de la absorción en torno a 430 nm y una disminución de la absorción a 412 nm debido a la coordinación de un átomo de nitrógeno de los inhibidores con el átomo de hierro del grupo hemo. Esta variación en la absorción (transición de tipo II) confirma que como se ha descrito anteriormente para el CYP125A3 de *M. smegmatis*, y para el CYP142A2 de *M. tuberculosis* (Driscoll *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011), todos ellos actúan como inhibidores del citocromo CYP142A2. Conforme se incrementa la concentración del inhibidor las diferencias de absorción entre el máximo en torno a 430 nm y el mínimo en torno a 412 nm se acentúan. La representación gráfica de estas diferencias y el posterior ajuste de los datos (Fig. 21D, 21E y 21F) permitió estimar que las constantes de afinidad aparentes ( $K_d$ ) para el econazol, miconazol y clotrimazol son  $7.40 \pm 0.52$ ,  $6.58 \pm 0.70$  y  $16.20 \pm 0.75$ , respectivamente.

## Resultados



**Figura 21. Ensayos de unión del citocromo CYP142A2 a econazol, miconazol y clotrimazol.** (A-C) Espectros de absorción resultantes de la diferencia entre el espectro de absorción de la proteína unida a inhibidor y la proteína libre: econazol (A), miconazol (B) y clotrimazol (C). Las concentraciones de inhibidores probadas fueron: econazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu$ M; miconazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 15  $\mu$ M; clotrimazol, 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 y 35  $\mu$ M. (E-F) Representación gráfica de las diferencias de absorbancia entre el

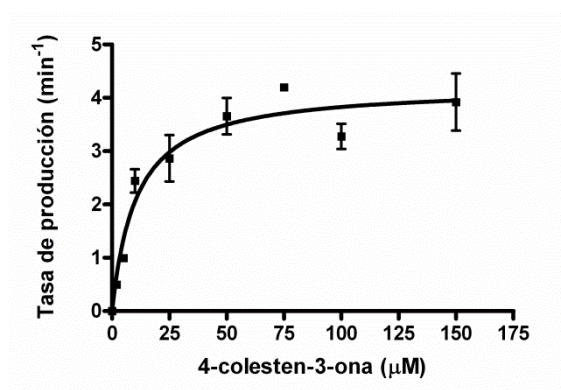
máximo en torno a 419-430 nm y el mínimo en torno a 390 nm para cada concentración de econazol (**D**), miconazol (**E**) y clotrimazol (**F**) probadas. El ajuste de los datos permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para cada sustrato.

### 1.3.3. Ensayos de actividad monooxigenasa

El estudio de la actividad enzimática del CYP142A2 se realizó de la misma manera que se describió para el citocromo CYP125A3 (apartado 1.2.3. de esta sección). Los ensayos se realizaron con diferentes concentraciones de colesteno disuelto en 0.05% de ciclodextrina y los productos generados tras 0, 5 y 20 min de incubación a cada concentración de sustrato se analizaron mediante HPLC. Al igual que ocurría con el citocromo CYP125A3, los tres intermediarios de reacción, 26-hidroxi-4-colesten-3-ona, 4-colesten-3-ona-26-al y ácido 4-colesten-3-ona-26-oico (Fig. 14), fueron identificados, pero en este caso la producción del derivado ácido, producto final de la reacción de estos citocromos, fue mucho más evidente que en el caso del citocromo Cyp125A3, donde tan solo se pudieron detectar pequeñas trazas.

A pesar de que la producción del derivado ácido fue más elevada, con el objetivo de poder comparar la actividad enzimática entre los dos citocromos, los parámetros cinéticos del CYP142A2 se calcularon a partir de los datos de producción de 26-hidroxi-4-colesten-3-ona, tal y como se realizó con el CYP125A23. El cálculo de la velocidad de reacción y posterior ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten (ver apartado 7 de Materiales y Métodos) permitió el cálculo de los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $K_{cat}$  para el citocromo CYP142A2, que fueron de  $10.3 \pm 2.5 \mu M$  y  $4.2 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$  respectivamente (Fig. 22).

## Resultados



**Figura 22. Cinética enzimática del citocromo CYP142A2.** En la gráfica se representa la tasa de producción del intermediario 26-hidroxi-4-colesten-3-ona a las diferentes concentraciones de colesteno probadas (2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$ ). Los datos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten para calcular los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $K_{cat}$ .

### 1.4. Implicación de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 en el metabolismo del colesterol en *M. smegmatis*

Una vez demostrado que los citocromos P450 CYP125A3 (codificado por el gen *MSMEG\_5995*) y CYP142A2 (codificado por el gen *MSMEG\_5918*) de *M. smegmatis* catalizaban las reacciones de hidroxilación en el carbono C26 de la cadena lateral del colesterol y la colesteno hasta la producción de los derivados ácido 3- $\beta$ -hidroxi-5-colesten-26-oico y ácido 4-colesten-3-ona-26-oico, se procedió a estudiar cuál era el papel fisiológico de estas proteínas en el metabolismo del colesterol en esta cepa. Para ello, los genes que codifican estas actividades se inactivaron mediante delección por recombinación homóloga empleando el plásmido no replicativo en micobacterias pJQ200x (Jackson *et al.*, 2001) (Tabla 2 de la sección Materiales y Métodos). Los mutantes simples  $\Delta\text{Cyp125}$  y  $\Delta\text{Cyp142}$ , así como el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  se emplearon para realizar estudios de crecimiento en colesterol y colesteno, y análisis de metabolitos secundarios acumulados en el medio de cultivo. Además se analizó la

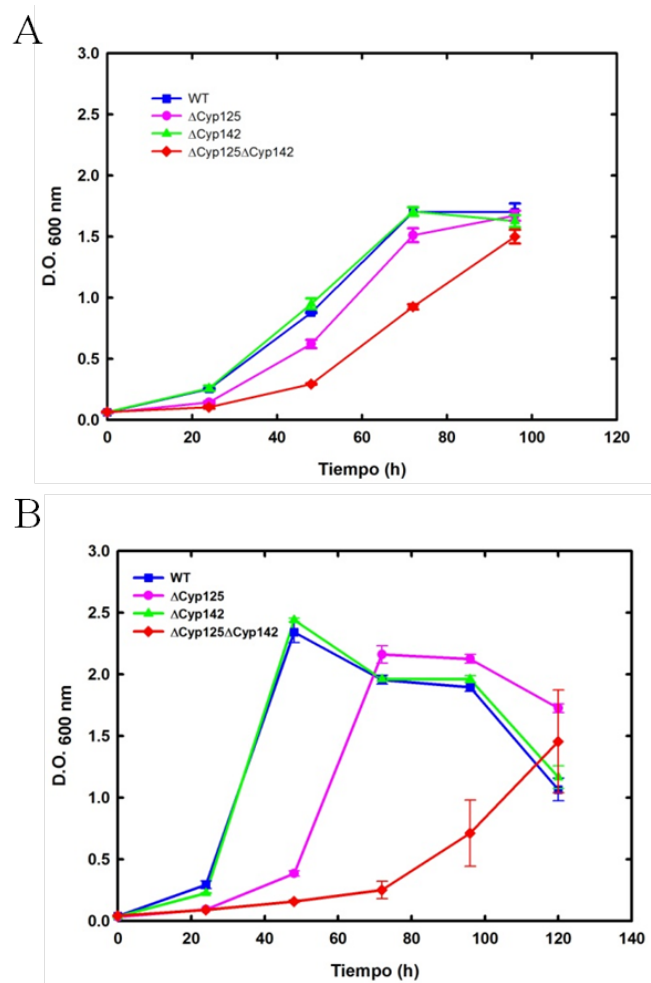
expresión de los genes en las diferentes cepas mediante experimentos de qRT-PCR, así como la producción de las proteínas mediante la técnica de *Western blot*.

#### **1.4.1. Estudios de crecimiento en colesterol y colestenoona de los diferentes mutantes**

Con el propósito de comprobar si la mutagénesis de los genes *MSMEG\_5995* (CYP125A3) y *MSMEG\_5918* (CYP142A2) impedía la utilización de colesterol o colestenoona por parte de *M. smegmatis*, los diferentes mutantes obtenidos  $\Delta$ Cyp125,  $\Delta$ Cyp142 y  $\Delta$ Cyp125  $\Delta$ Cyp142 junto con la cepa silvestre se cultivaron en medio mínimo con 1.8 mM de colesterol o colestenoona como única fuente de carbono. Como puede verse en la figura 23A, cuando las cepas se cultivaron en presencia de colesterol, apenas existen diferencias en las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y los mutantes simples, obteniéndose una tasa de duplicación muy similar para todas ellas (21 h para la cepa silvestre y el mutante  $\Delta$ Cyp142, 20 h para el mutante  $\Delta$ Cyp125) (Tabla 5). Sin embargo, en el caso del doble mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142, sí que se observa una disminución en la velocidad de crecimiento, siendo en este caso la tasa de duplicación de 25 h (Tabla 5). Cuando se empleó la colestenoona como fuente de carbono, las diferencias se vieron acentuadas. Como se muestra en la figura 23B, el mutante  $\Delta$ Cyp125 presenta una fase de latencia inicial más larga que la cepa silvestre, aunque una vez que empieza a dividirse alcanza una tasa de duplicación similar (17 h respecto a 13 h de la cepa silvestre). El doble mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 presenta serias dificultades en el crecimiento, con una fase de latencia inicial de unas 72 h y una tasa de duplicación (39 h) que triplica la de la cepa silvestre. A pesar de este importante retraso en el crecimiento, el doble mutante alcanza niveles de biomasa similares a la cepa silvestre al finalizar el crecimiento.



## Resultados



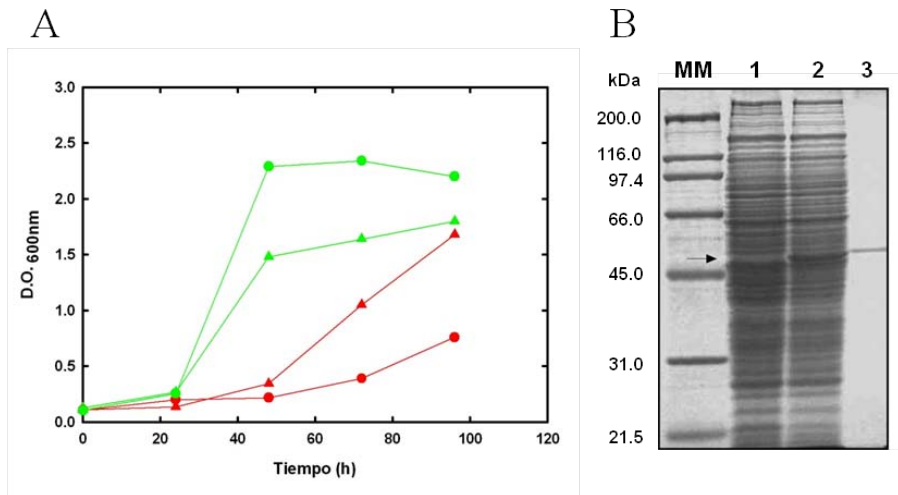
**Figura 23. Curvas de crecimiento de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y las cepas mutantes  $\Delta$ Cyp125,  $\Delta$ Cyp142 y  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 en colesterol (A) y colesthenona (B) como única fuente de carbono. Los valores representados corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras de error indican  $\pm 1$  desviación estándar.**

El hecho de que el mutante simple  $\Delta$ Cyp142 no presente ningún defecto en el crecimiento en colesterol y colesthenona, pero sí la cepa  $\Delta$ Cyp125, sugiere que muy probablemente el citocromo CYP125A3 sea el principal citocromo encargado de la

hidroxilación de la cadena lateral de estos esteroides en *M. smegmatis*. Para comprobar esta hipótesis, el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  se complementó con el plásmido pMV5995 (Tabla 2 de la sección Materiales y Métodos), derivado del plásmido pMV261 que porta una copia del gen *MSMEG\_5995* (CYP125A3) bajo el control de un promotor constitutivo en micobacterias. En la figura 24B, se muestra la presencia de la proteína CYP125A3 en un extracto proteico del doble mutante complementado con el plásmido pMV5995, mientras que dicha proteína está ausente en el extracto proteico de la cepa que porta el plásmido pMV261. El crecimiento de ambas cepas en colesterol y colesteno como única fuente de carbono se muestra en la figura 24A. En presencia de ambos esteroides el doble mutante complementado con el plásmido que expresa el citocromo CYP125A3 recupera los niveles de crecimiento de la cepa silvestre, alcanzando las tasas de duplicación de ésta (16 h en colesterol y 13 horas en colesteno) (Tabla 5). Por el contrario, el doble mutante que porta el plásmido vacío no presenta ninguna mejora en el crecimiento, e incluso alcanza tasas de duplicación mayores con respecto al doble mutante (27 h en colesterol y 44 h en colesteno) (Tabla 5) muy probablemente debido a la presencia del antibiótico (kanamicina) añadido para asegurar la permanencia del plásmido. De estos resultados se deduce que aunque CYP142A2 es capaz de reemplazar al CYP125A3 cuando éste no está presente, el citocromo CYP125A3 por sí solo es suficiente para permitir el crecimiento de *M. smegmatis* con estos esteroides como fuente de carbono.

La capacidad del doble mutante de crecer en colesterol y colesteno sugiere la existencia de otro citocromo P450 codificado en el genoma de *M. smegmatis* capaz de catalizar la misma reacción que los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, permitiendo a la bacteria crecer cuando éstos están ausentes.

Resultados



**Figura 24. Análisis del doble mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 complementado con los plásmidos pMV261 y pMV5995. (A)** Curvas de crecimiento en colesterol (triángulos) y colestenona (círculos) del doble mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 complementado con el plásmido pMV261 (líneas rojas) y el plásmido pMV5995 (líneas verdes). **(B)** Análisis mediante PAGE-SDS de la producción del citocromo CYP125: calle 1,  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 (pMV261); calle 2,  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 (pMV5995). En la calle 3 se cargó 1 pmol de proteína CYP125A3 purificada. MM: marcador de masa molecular. La flecha indica la posición en el gel del citocromo CYP125A3.

Cepa	Tasa de duplicación (h)	
	Colesterol	4-colesten-3-ona
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	21	13
$\Delta$ Cyp125	20	17
$\Delta$ Cyp142	21	13
$\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142	25	39
$\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 (pMV261)	27	44
$\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142 (pMV5995)	16	13

**Tabla 5. Tasa de duplicación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y los diferentes mutantes creciendo en colesterol y colesthenona como única fuente de carbono.**

#### 1.4.2. Análisis de la producción de metabolitos intermediarios de la degradación de 4-colesten-3-ona en los diferentes mutantes.

Los ensayos enzimáticos mostrados en los apartados 1.2.3. y 1.3.3. demostraron que los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 son capaces de catalizar los primeros pasos de oxidación en la posición C26 de la cadena lateral de la colesteno, formando inicialmente el derivado alcohol, a continuación el aldehído y finalmente el ácido. Para determinar la implicación de cada uno de los citocromos en el metabolismo de estos esteroides en *M. smegmatis*, las distintas cepas mutantes junto con la cepa silvestre se cultivaron en medio mínimo con colesteno como única fuente de carbono y se analizó a diferentes tiempos de incubación la producción de los intermediarios 26-hidroxi-4-colesten-3-ona y ácido 4-colesten-3-ona-26-oico mediante HPLC-MS.

Como se observa en la figura 25A, la producción de estos compuestos en la cepa silvestre tiene lugar durante las primeras horas de cultivo, alcanzando los niveles máximos a las 24 h. A las 48 h de cultivo, ninguno de los dos compuestos se detecta, debido a que son metabolizados por las enzimas responsables de los siguientes pasos de la degradación de la cadena lateral.

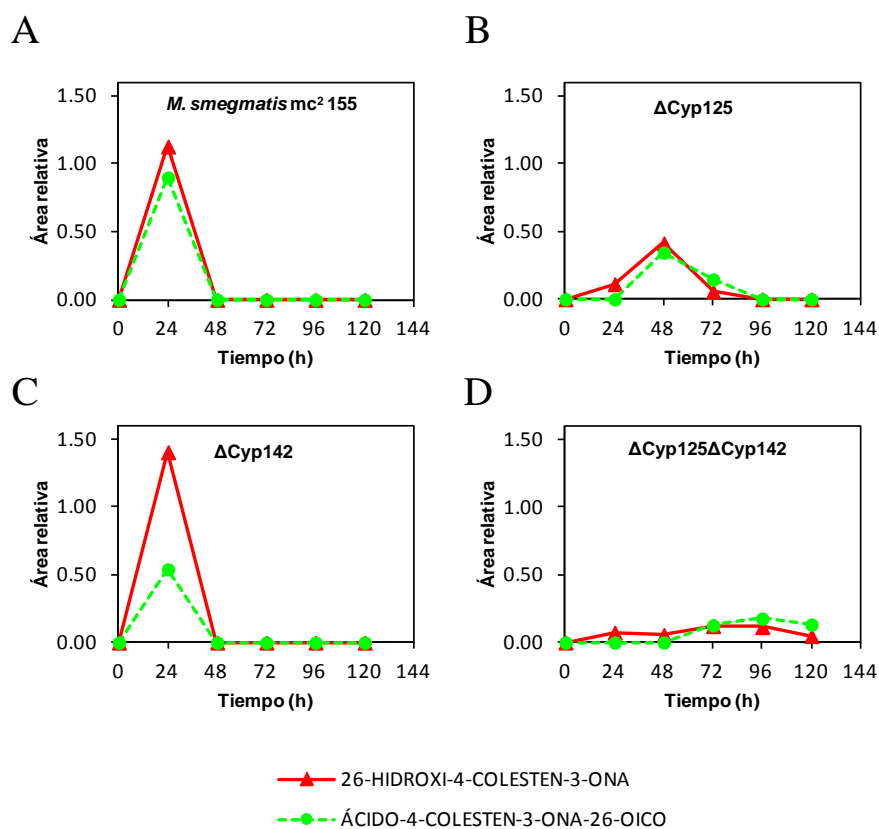
En el mutante  $\Delta$ Cyp125 la producción de estos metabolitos es menor y además no se detectan prácticamente hasta las 24 h, alcanzándose la máxima producción a las 48 h (Fig. 25B). En esta cepa la producción se debe exclusivamente al citocromo CYP142, por lo que puede decirse que, aunque el CYP142 es capaz de desempeñar la función del CYP125 cuando éste no está, pero lo hace de una forma menos eficiente.

En el caso del mutante  $\Delta$ Cyp142, el derivado alcohol se produce en cantidades muy similares a las producidas en la cepa silvestre, sin embargo, la producción del derivado ácido es algo más reducida, observándose unos niveles similares a los producidos por la cepa  $\Delta$ Cyp125 (Fig. 25C). En este mutante simple  $\Delta$ Cyp142 la producción de los dos intermediarios tiene lugar gracias a la acción del citocromo CYP125, lo que indica que éste podría tener una cierta preferencia por la catálisis del primer paso de oxidación del carbono C26 de la cadena lateral, y el CYP142 podría

## Resultados

contribuir en mayor medida a la producción del derivado ácido. Sin embargo, no se sabe si en las condiciones celulares la catálisis hasta el ácido se lleva a cabo sin que el sustrato abandone el centro activo del citocromo.

Por último, en el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  la acumulación de los dos intermediarios se reduce drásticamente (Fig. 25D), incluso a tiempos largos de incubación ( $> 72$  h) que es cuando la cepa empieza a crecer (Fig. 23B). Probablemente la pequeña producción observada se deba, tal y como se ha comentado anteriormente, a la actividad de algún otro citocromo P450 codificado en el genoma de *M. smegmatis* que puede catalizar las reacciones de oxidación llevadas a cabo por CYP125 y CYP142.



**Figura 25. Análisis mediante HPLC-MS de los metabolitos intermediarios producidos por los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 acumulados durante el crecimiento en colesteno de *M. smegmatis*. (A) cepa silvestre, (B) mutante  $\Delta$ Cyp125, (C) mutante  $\Delta$ Cyp142 y (D) mutante  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142.**

### **1.4.3. Análisis de la expresión endógena de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2**

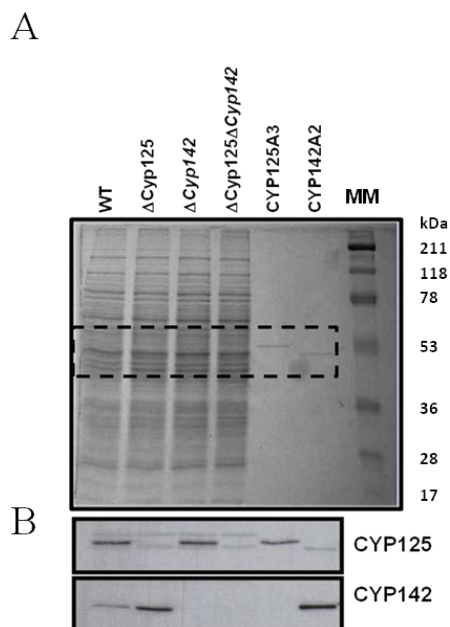
Los resultados mostrados anteriormente sugieren que cuando el CYP125A3 no está presente, el CYP142A2 es capaz de reemplazar su función. Para profundizar en el estudio de estas proteínas *in vivo*, se procedió a analizar la expresión de ambos citocromos tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional en las diferentes cepas estudiadas.

#### **1.4.3.1. Análisis de la expresión de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 mediante *Western blot***

La expresión endógena de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 fue analizada en las diferentes cepas mutantes ( $\Delta$ Cyp125,  $\Delta$ Cyp142 y  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142) y en la cepa silvestre mediante experimentos de *Western blot* empleando anticuerpos policlonales obtenidos frente a los citocromos CYP125 y CYP142 de *M. tuberculosis* (cedidos por el profesor P. Ortiz de Montellano, UCSF, San Francisco, California, EE.UU.). Las diferentes cepas se cultivaron en 1.8 mM de colesterol hasta una D.O. equivalente a la mitad de la fase exponencial (aproximadamente 48 h de cultivo en la cepa silvestre y en los mutantes simples, y 72 h de cultivo en el doble mutante), momento en el cual las células se recogieron por centrifugación y posteriormente fueron sonicadas para obtener los extractos proteicos correspondientes. Los extractos proteicos obtenidos y las proteínas purificadas CYP125A3 y CYP142A2 se analizaron mediante PAGE-SDS (Fig. 26A) y se realizó un Western blot tal y como se especifica en el apartado 6.5. de la sección Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 26B, el citocromo CYP125A3 se expresa al mismo nivel tanto en la cepa silvestre como en el mutante  $\Delta$ Cyp142. Sin embargo, la expresión del citocromo CYP142A2 es mayor en el mutante  $\Delta$ Cyp125 en

## Resultados

comparación con los niveles obtenidos en la cepa silvestre. Esto indica que cuando el citocromo CYP125A3 no está presente, la expresión del CYP142A2 se induce para suplir la falta del primero.



**Figura 26. Análisis de la expresión de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 en *M. smegmatis*.** (A) Análisis mediante PAGE-SDS de los extractos proteicos de la cepa silvestre y las cepas mutantes ( $\Delta$ Cyp125,  $\Delta$ Cyp142 y  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142) y de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 purificadas de *M. smegmatis*. MM: marcadores de peso molecular. El recuadro en línea discontinua indica la región del gel que corresponde a la imagen mostrada del *Western blot*. (B) Análisis mediante *Western blot* de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 en las diferentes cepas de *M. smegmatis*.

### 1.4.3.2. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR

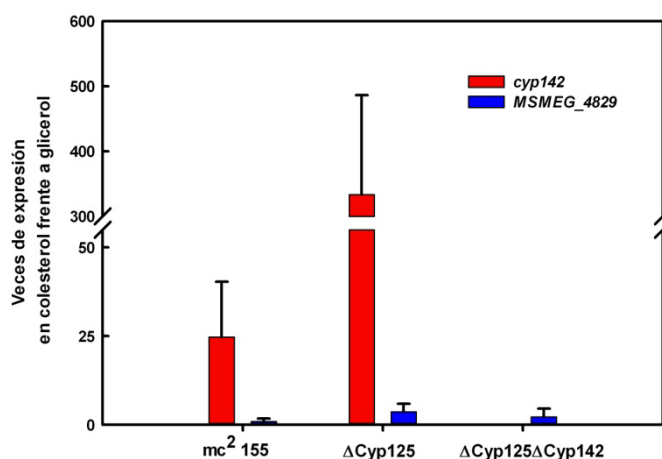
Para comprobar si el incremento en los niveles de la proteína CYP142A2 en el mutante  $\Delta$ Cyp125 se correlacionaba con un incremento de la expresión del gen que la codifica (*MSMEG\_5918*), se realizaron experimentos de qRT-PCR en los que se analizó la

expresión de este gen en el mutante simple  $\Delta\text{Cyp125}$ , en el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  y en la cepa silvestre cultivada en colesterol o glicerol como fuentes de carbono. En la figura 27 se muestra la expresión diferencial en colesterol frente a glicerol de dicho gen en cada una de las cepas analizadas. Como puede observarse, en el mutante  $\Delta\text{Cyp125}$  la expresión del gen que codifica el citocromo CYP142 es claramente superior a la que tiene lugar en la cepa silvestre (13 veces). Esta inducción en la expresión génica se correlaciona con los mayores niveles de la proteína CYP142 detectados mediante los experimentos de *Western blot*.

Como se comentó al principio de este capítulo, en los experimentos de *microarrays* llevados a cabo en el laboratorio previamente a la realización de esta Tesis Doctoral, se observó que el gen *MSMEG\_4829*, que codifica un citocromo P450, presentaba una inducción en colesterol de 10.7 veces frente a glicerol (Uhía *et al.*, 2012). Este gen no está regulado por ninguno de los dos represores descritos hasta la fecha que regulan la expresión de los genes implicados en la degradación del colesterol, KstR y KstR2 y además se localiza fuera de los dos grandes *clusters* identificados en el genoma de *M. smegmatis* donde se agrupan la mayoría de los genes implicados en el metabolismo de colesterol y otros esteroides. El hecho de que el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  crezca en colesterol y colestenoa planteó la posibilidad de que el citocromo codificado por el gen *MSMEG\_4829* pudiera ser el encargado de reemplazar a los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 cuando éstos están ausentes. Para comprobar esta hipótesis, la expresión de dicho gen fue analizada mediante qRT-PCR. Como puede observarse en la figura 27, la expresión de este gen está ligeramente inducida en colesterol frente a glicerol (0.8 veces en la cepa silvestre, 3.6 veces en el mutante  $\Delta\text{Cyp125}$  y 2.2 veces en el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$ ), aunque los niveles de expresión son extremadamente bajos si los comparamos con los niveles de expresión del citocromo CYP142A2 en estas mismas cepas..



## Resultados



**Figura 27. Expresión diferencial de los genes *MSMEG\_5918* (*cyp142*) y *MSMEG\_4829* en la cepa silvestre y las cepas mutantes  $\Delta$ Cyp125 y  $\Delta$ Cyp125 $\Delta$ Cyp142.** En la gráfica se representa la expresión de los genes en colesterol con respecto a la expresión de los mismos en glicerol. Los valores corresponden a la media de tres réplicas biológicas independientes y las barras de error indican  $\pm 1$  desviación estándar.

### 1.5. Análisis de las estructuras de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis*.

La cristalización de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis* se realizó en el laboratorio de la Prof. Larissa M. Podust. en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de California en San Francisco (UCSF) fruto de una colaboración establecida durante mi estancia en el laboratorio del Prof. P. Ortiz de Montellano en esta misma Universidad.

Las proteínas purificadas CYP125A3 y CYP142A2 fueron sometidas a una batería de diferentes condiciones de cristalización, obteniéndose varios cristales cuya estructura fue determinada mediante reemplazamiento molecular empleando como modelo las estructuras de los citocromos CYP125A1 (PDB: 2X5W) y CYP142A1 (PDB: 2XKR) de *M. tuberculosis*. La estructura del citocromo CYP142A2 ha sido resuelta tanto

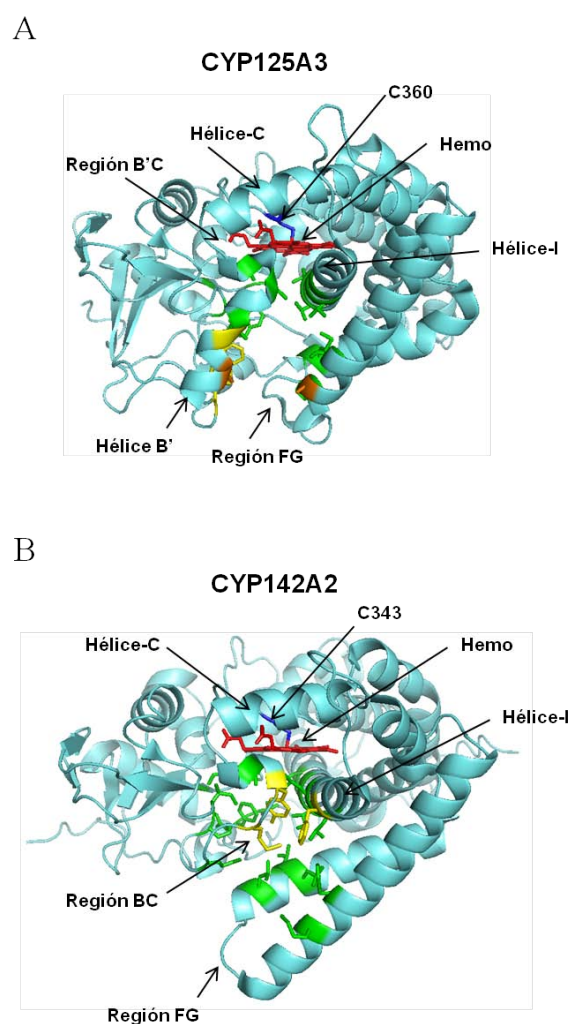
en su forma libre (PDB: 3ZBY) como unida a colesteno (PDB: 2Y00). Sin embargo, en el caso del CYP125A3 sólo se pudo resolver su estructura en ausencia de colesteno (PDB: 4APY).

Las estructuras de ambas proteínas son muy parecidas a las estructura de todos los citocromos P450 cristalizados hasta la fecha (Munro *et al.*, 2013). Se trata de proteínas compuestas principalmente de hélices- $\alpha$  con un pequeño dominio de lámina- $\beta$  (Fig. 28). El hierro del grupo hemo (representado en rojo) se encuentra coordinado con una cisteína (C360 en CYP125A3 y C343 en CYP142A2)(representada en azul) que se conserva en todos los citocromos P450 (Leys *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007) y es esencial para la actividad monooxigenasa de estas proteínas (Auclair *et al.*, 2001). Los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis* descritos en este trabajo presentan una identidad de secuencia del 31%, y sin embargo como puede observarse en la figura 28 su estructura en ausencia de sustrato es muy parecida. Las mayores diferencias estructurales entre unos citocromos y otros se encuentran en las regiones FG, B'C y la hélice I. Las hélices FG junto con la hélice B' determinan el acceso al centro activo. En el caso de CYP125A3, las hélices F y G están orientadas hacia el interior de la proteína (Fig. 28A), mientras que en el CYP142A2 se localizan más externamente (Fig. 28B), lo que podría indicar que esta proteína podría aceptar como sustratos otros esteroides más largos con modificaciones en el C3. Otra de las regiones importantes que pueden determinar la especificidad de sustrato de los citocromos P450 es la región B'C. La disposición del bucle formado por estas dos hélices así como la disposición de la hélice C pueden causar un cierto hundimiento de la hélice I, incrementándose la posibilidad de que se origine un nuevo canal para la entrada del sustrato (Poulos and Johnson, 2005). En los alineamientos de las secuencias de las proteínas CYP125 y CYP142 de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* (Fig. 29) puede observarse que los citocromos CYP142 carecen de la secuencia correspondiente a la hélice B' (región representada en magenta en los CYP125) lo que hace que la disposición del sitio de unión al sustrato de estas proteínas sea considerablemente diferente al del CYP125. Además de estas dos importantes variaciones entre los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, que podrían

## Resultados

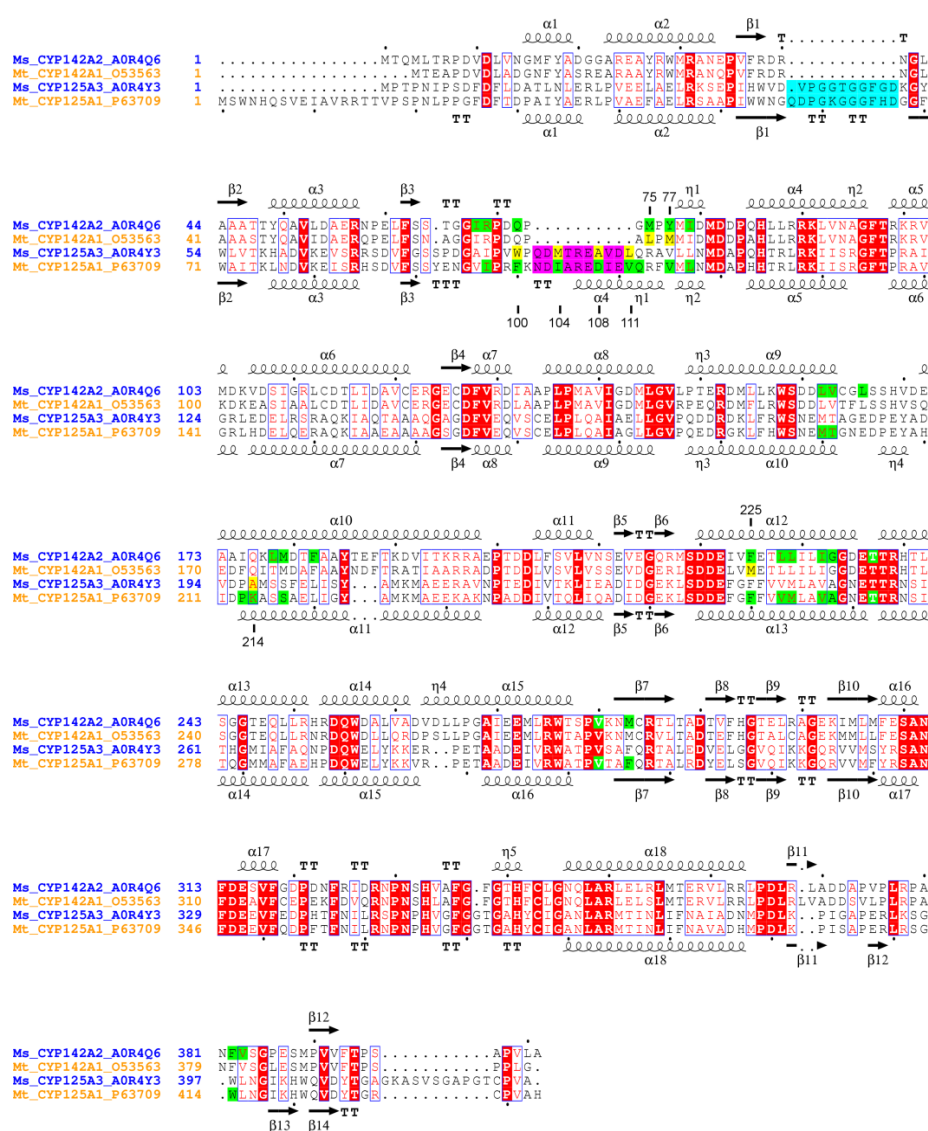
tener alguna implicación en la fisiología de las dos proteínas, existe una tercera diferencia, que consiste en la ausencia de otros 10 aminoácidos en el CYP142A2 justo a continuación de la lámina- $\beta$ 1 (Fig. 29, secuencia representada en azul).

La estructura del citocromo CYP125A3 de *M. smegmatis* es bastante similar a la de su ortólogo en *M. tuberculosis*. Aunque la estructura de la proteína unida a sustrato no ha podido ser caracterizada, la posición de éste puede deducirse a partir de la estructura del CYP125A1 unida a colesteno (PDB: 2X5W) obtenida para *M. tuberculosis* (Ouellet *et al.*, 2010). Basándose en esta estructura, la mayoría de los residuos que contactan con la colesteno estarían conservados en ambas proteínas (Fig. 29 y 30, residuos señalados en verde), aunque existen algunas sustituciones que distinguen el sitio de unión a sustrato de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*: F100→W83, I104→M87, D108→A91, V111→L94 y K214→A197 (Fig. 29, residuos en amarillo, Fig. 30, residuos señalados en amarillo y naranja). De todas ellas las sustituciones de los residuos D108 y K214 (Fig. 30, señalados en naranja) son las que tienen una mayor importancia, ya que supone la pérdida del puente salino que protege la entrada al centro activo. Estos dos residuos en *M. smegmatis* son alaninas.



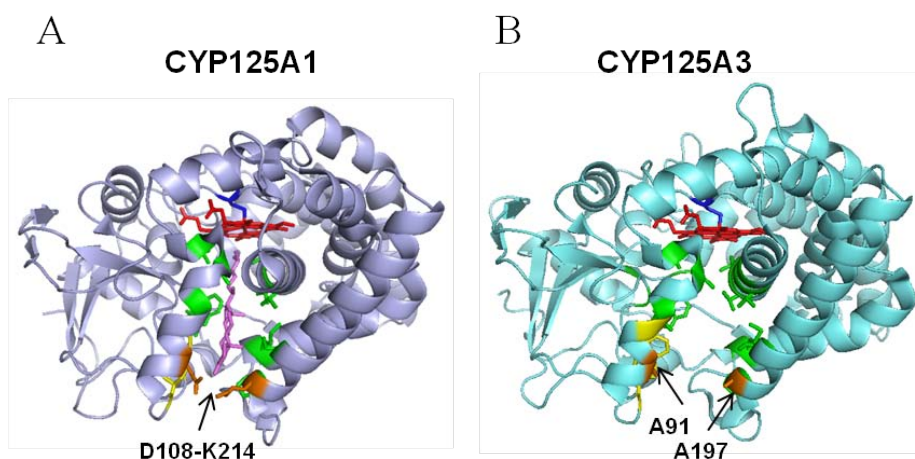
**Figura 28. Comparación de las estructuras de los citocromos CYP125A3 (A) y CYP142A2 (B) de *M. smegmatis* en ausencia de sustrato.** El código de colores empleado es el siguiente: rojo, grupo hemo; azul oscuro, cisteína conservada que interacciona con el grupo hemo; verde, residuos implicados en la interacción con el sustrato que se conservan en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*; amarillo, residuos implicados en la interacción con el sustrato que no se conservan en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*; naranja, residuos no conservados implicados en la unión del sustrato que suponen la pérdida del puente salino que protege la entrada al centro activo en el CYP125A1 de *M. tuberculosis*.

## Resultados



**Figura 29. Alineamiento de las secuencias de las proteínas CYP125 y CYP142 de *M. smegmatis* (Ms) y *M. tuberculosis* (Mt).** El alineamiento de secuencias se ha realizado mediante ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). En cada secuencia se especifica el número de acceso de cada proteína en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Los diferentes elementos de estructura secundaria y la numeración de los residuos se han asignado en función de las estructuras 2Y00 del CYP142A2 (secuencia superior) y 2X5W del Cyp125A1 (secuencia inferior) (α, hélice-α; β, lámina-β; η, hélice-3<sub>10</sub>; T, giro-β). Los residuos conservados en

las cuatro proteínas se han sombreado en rojo. Los residuos que interaccionan con la colestenoona con una distancia inferior a 5 Å se representan en verde. En amarillo se indican las diferencias entre las dos especies. En azul y en magenta se representan las regiones ausentes en los citocromos CYP142 en ambas especies.

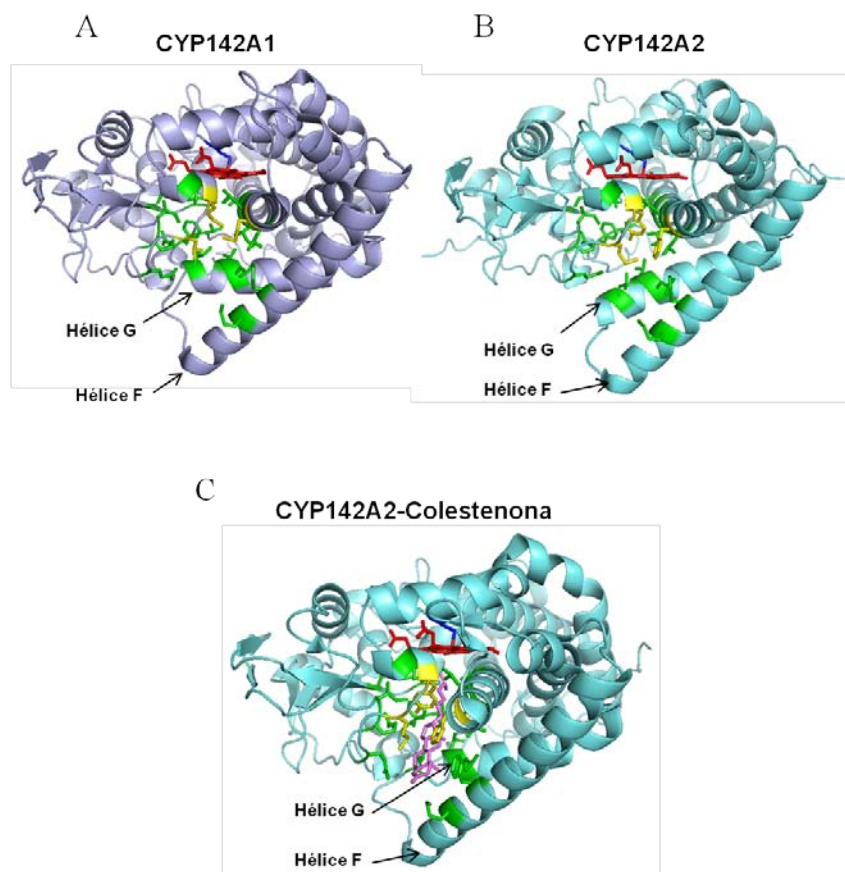


**Figura 30. Comparación de las estructuras de los citocromos CYP125 en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.** (A) Estructura del citocromo CYP125A1 de *M. tuberculosis* unido a colestenoona (PDB: 2X5W). En violeta se muestra la molécula de la colestenoona en el centro activo. Se indica el puente salino establecido entre los residuos D108 y K214 (señalados en naranja). (B) Estructura del citocromo CYP125A3 de *M. smegmatis* en ausencia de sustrato (PDB: 4APY). Se indican en naranja las sustituciones de los residuos D108 y K214 de *M. tuberculosis*.

La proteína CYP142A2 en ausencia de sustrato presenta una conformación más abierta que su ortólogo en *M. tuberculosis*, debido al posicionamiento de las hélices F y G (Fig. 31A y 31B). En presencia de colestenoona, se produce la apertura de la hélice G para dar soporte a la molécula de sustrato (Fig. 31C). Como ocurría en el caso del CYP125A3, aunque la mayoría de los residuos del CYP142A2 que interaccionan con la colestenoona no varían con respecto a su ortólogo en *M. tuberculosis* (Fig. 29 y 31, residuos señalados en verde), existen algunas sustituciones (señaladas en amarillo):

## Resultados

L72→M75, M74→Y77 y M222→F255. Estos residuos en *M. smegmatis* son más voluminosos, lo que distingue el centro activo de la proteína en ambas especies.



**Figura 31. Comparación de las estructuras de los citocromos CYP142 en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.** (A) Estructura del citocromo CYP142A1 de *M. tuberculosis* en ausencia de sustrato (PDB: 2XKR). (B) Estructura del citocromo CYP142A2 de *M. smegmatis* en ausencia de sustrato (PDB: 3ZBY). (C) Estructura del citocromo CYP142A2 de *M. smegmatis* en presencia de colesteno. En violeta se muestra la molécula de la colesteno en el centro activo. En todas las estructuras se señala la posición de las hélices F y G que constituyen la entrada al centro activo.

## 2. Estudio de la regulación transcripcional del catabolismo del colesterol mediada por el regulador KstR

---

A pesar del papel fundamental que desempeña el catabolismo del colesterol en la persistencia de *M. tuberculosis* durante la fase crónica de la infección (Van der Geize *et al.*, 2007; Pandey and Sassetti, 2008; Chang *et al.*, 2009; Griffin *et al.*, 2012) los mecanismos de regulación mediados por el regulador principal del catabolismo del colesterol, el represor KstR, así como la naturaleza de la molécula inductora de la desrepresión han sido poco estudiados hasta la fecha. Las principales moléculas propuestas como inductoras de KstR han sido el propio colesterol y la colesteno, puesto que constituyen los primeros intermediarios de la ruta de degradación y porque se ha comprobado que la adición de estas sustancias al medio de cultivo induce la expresión de los genes implicados en la ruta degradativa del colesterol (Kendall *et al.*, 2007; Nesbitt *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2011; Uhía *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta la fecha no ha sido demostrada la interacción *in vitro* de estos compuestos con el represor KstR y por consiguiente no había sido posible determinar si éstos son realmente los verdaderos inductores de la ruta catabólica del colesterol (Uhía *et al.*, 2011a).

Por estas razones, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha consistido en el estudio del mecanismo de represión transcripcional mediado por la proteína KstR en *M. smegmatis* así como la búsqueda de la(s) molécula(s) inductoras que producen la desrepresión de la ruta de degradación del colesterol. En este apartado se presentan los resultados obtenidos en relación a este objetivo.

### 2.1. Análisis *in silico* de la proteína KstR de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155

Como se ha comentado en el apartado Introducción, la proteína KstR, codificada por el gen *MSMEG\_6042* de *M. smegmatis* y por el gen *Rv3574* en *M. tuberculosis*, es un regulador transcripcional de la familia TetR que controla la



## Resultados

expresión de 83 y 74 genes en cada una de estas cepas respectivamente implicados en las rutas alta y media de degradación del colesterol (regulón KstR)(Kendall *et al.*, 2007; Nesbitt *et al.*, 2010; Uhía *et al.*, 2011a). Esta familia de reguladores transcripcionales está ampliamente distribuida entre las bacterias y es fácilmente reconocible por su dominio HTH de unión al DNA que presenta un alto grado de similitud entre todos los miembros de la familia. Sin embargo, la secuencia correspondiente al dominio de unión a ligando no está conservada debido a la gran variabilidad de señales que reconocen este tipo de reguladores (Ramos *et al.*, 2005). Los reguladores TetR suelen estar constituidos por un dímero y se unen al DNA a través de una secuencia palindrómica. El represor KstR se une en forma de dímero al motivo conservado TnnAACnnGT'TnnA que se encuentra en su propio promotor y en 31 regiones intergénicas más del genoma de *M. smegmatis* (Kendall *et al.*, 2007).

La región del genoma donde se localiza el gen *MSMEG\_6042* está muy conservada dentro del género *Mycobacterium*. En posición divergente a él se encuentra el gen *MSMEG\_6041*, que codifica una acil-CoA deshidrogenasa (FadE34). En posición 5' a este gen se localizan los genes *MSMEG\_6040* (proteína hipotética) y *MSMEG\_6039* que presenta un 73% de identidad con el gen *Rv3571* de *M. tuberculosis*, el cual codifica el componente reductasa (KshB) de una cetoesteroide-9- $\alpha$ -hidroxilasa (KSH) responsable de la reacción de hidroxilación de los compuestos AD y ADD en sus respectivos derivados 9- $\alpha$ -hidroxilados (Capyk *et al.*, 2009). En posición divergente al gen *MSMEG\_6039*, se localiza el operón formado por los genes *MSMEG\_6035-6038*, los cuales presentan en torno al 80% de identidad con el operón *Rv3567c-3570c* de *M. tuberculosis* que codifica las proteínas HsaB, HsaC, HsaD y HsaA respectivamente, implicadas en los últimos pasos de la ruta central de degradación del colesterol (Yam *et al.*, 2009; Dresen *et al.*, 2010; Lack *et al.*, 2010) (ver Introducción).

El ortólogo al KstR en *R. jostii* RHA1 está codificado por el gen *ro04482*, y aunque todos los genes descritos anteriormente que se localizan junto al represor en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* están presentes también en el genoma de *R. jostii* RHA1, la organización génica de los mismos en esta bacteria es diferente. Al igual que ocurre en

*M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, el gen que codifica la proteína KstR se localiza junto al gen *fadE34* (*ro4483*) en la misma región génica que el operón *igr* (descrito en el capítulo 1 de Resultados). Sin embargo, el gen que codifica la reductasa KshB (*ro05833*) y los genes que codifican las proteínas HsaB, HsaC, HsaD y HsaA (operón *ro04542-04530*) (Van der Geize *et al.*, 2007; Dresen *et al.*, 2010; Mathieu *et al.*, 2010) se sitúan en otra región del genoma.

La comparación de la secuencia de la proteína KstR de *M. smegmatis* frente a la totalidad de las secuencias proteicas de las bases de datos utilizando el programa BlastP ha permitido la identificación de proteínas con un elevado porcentaje de identidad en otras bacterias. Como puede observarse en la Tabla 6, las principales cepas en las que se ha encontrado proteínas homólogas a KstR pertenecen a los géneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Gordonia*. Dentro del género *Mycobacterium*, se han encontrado cepas de crecimiento lento, la mayoría de ellas patógenas (*M. tuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. bovis* y *M. avium*) y alguna oportunista (*M. tusciae*), y cepas de crecimiento rápido normalmente no patógenas (*M. sp* JLS, *M. vanbaalenii*, *M. givum*) y oportunistas (*M. fortuitum*, *M. rhodesiae* y *M. abscessus*). Hay que destacar que no se han encontrado homólogos a KstR en la cepa *M. leprae*, patógeno intracelular obligado causante de la lepra, ni en *M. aurum*, micobacteria de crecimiento rápido considerada como un patógeno oportunista. Exceptuando a *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. smegmatis*, se desconoce si el resto de los miembros del género *Mycobacterium* tiene la capacidad de crecer en colesterol como única fuente de carbono, pero todos ellos presentan en su genoma el operón *igr* y en posición divergente a éste el gen que codifica la tiolasa FadA5, imprescindibles para el crecimiento en colesterol (Chang *et al.*, 2009; Nesbitt *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011) (Tabla 6).

Dentro de los géneros *Rhodococcus*, *Nocardia* y *Gordonia* las proteínas homólogas a KstR encontradas presentan un porcentaje de identidad inferior al 75%. En estas bacterias tanto los genes del operón *igr* como el gen de la tiolasa FadA5 están presentes en el genoma, pero sin embargo, la organización génica de éstos es algo diferente. Todos los genes que forman el operón *igr* excepto el gen que codifica el

## Resultados

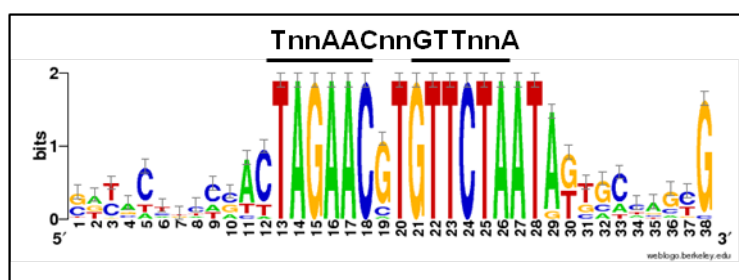
citocromo CYP125 se encuentran agrupados en una región del genoma, mientras que el citocromo y la tiolasa se encuentran juntos y en posición divergente uno respecto a otro en otra región génica.

Microorganismo	% ID	Nº acceso	Operón igr						
			6	5	4	3	2	1	1'
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	--	YP_890266.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3	93	YP_005000045.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium tusciae</i> JS617	92	WP_006243771.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium</i> sp. JLS	97	YP_001073353.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> DSM 46621	97	WP_003882450.1	<	<	<	<	<	<	<
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	91	YP_005336038.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	90	NP_218091.3	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1	89	YP_956089.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	89	YP_001132729.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG str. Korea 1168P	88	YP_007432770.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i>	88	WP_007166525.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAP4	89	YP_007973157.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	88	NP_338224.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Mycobacterium abscessus</i>	79	WP_005072723.1	<	<	<	<	<	<	>
<i>Rhodococcus equi</i>	74	WP_005515654.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Rhodococcus opacus</i> B4	74	YP_002781602.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	74	YP_704426.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Rhodococcus erythropolis</i> PR4	73	BAH31414.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Rhodococcus ruber</i>	72	WP_003935941.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Nocardia farcinica</i>	70	WP_011206976.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Gordonia sihwensis</i>	65	WP_006897295.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Gordonia neofelifaecis</i>	64	WP_009680555.1	<	<	<	<	<	*	*
<i>Gordonia bronchialis</i> DSM 43247	65	YP_003272087.1	<	<	<	<	<	*	*

Tabla 6. Proteínas de la familia de reguladores TetR homólogas al represor KstR de *M. smegmatis*. Se muestran aquellas especies que presentan una proteína homóloga a KstR con un *e-value* >  $e^{-50}$  y un porcentaje de identidad (%ID) superior al 65%. En la última columna se muestra la presencia de los genes del

operón *igr* (numerados del 1 al 5) y del gen de la tiolasa *FadA5* (numerado como 1') en cada una de las cepas. Las puntas de flecha (< y >) indican el sentido de la transcripción de cada uno de los genes. El asterisco (\*) indica que aunque los genes están presentes en el genoma, pero se encuentran en una región génica diferente.

En cada una de las cepas de la Tabla 6 se analizaron las secuencias operadoras para la unión de KstR en su propia región promotora. Todas ellas, al igual que se ha descrito en el caso de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, contenían la secuencia palindrómica de reconocimiento del KstR. El alineamiento de dichas secuencias ha permitido la elaboración de una secuencia consenso de unión del represor KstR, que como se muestra en la figura 32 coincide con el descrito para *M. tuberculosis* (Kendall *et al.*, 2007). La secuencia establecida como consenso a partir de las diferentes cepas analizadas es un palíndromo más perfecto, ya que incluso los nucleótidos establecidos como variantes en los extremos del mismo están conservados. El hecho de haber encontrado esta secuencia palindrómica en las regiones promotoras de estos genes así como la elevada identidad de secuencia de estas proteínas con el KstR de *M. smegmatis* apoyan la teoría de que este represor está altamente conservado dentro de las actinobacterias.

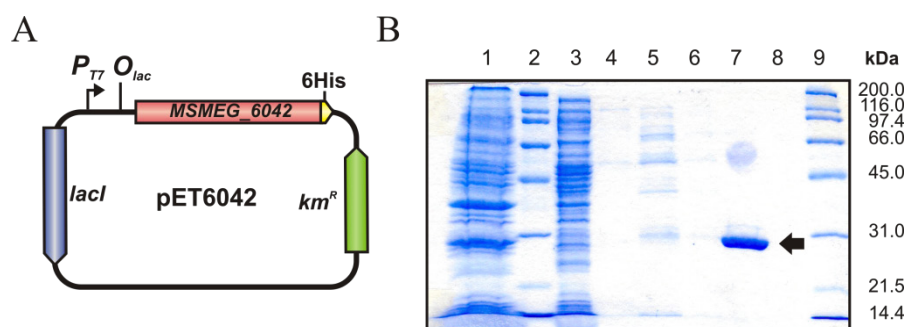


**Figura 32. Secuencia palindrómica consenso de unión del represor KstR.** La secuencia consenso se obtuvo mediante el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>) a partir de las regiones promotoras de los genes que codifican las proteínas homólogas a KstR en las diferentes bacterias incluidas en la Tabla 6. En la parte superior se muestra la región consenso descrita para el KstR de *M. tuberculosis*.

### 2.2. Hiperproducción y purificación de la proteína KstR

La proteína KstR de *M. smegmatis* ha sido objeto de estudio en una Tesis Doctoral previa en el laboratorio (Uhía, 2010), por lo que al comienzo de este trabajo ya se disponía de un sistema de hiperproducción y purificación optimizado de la proteína (Uhía *et al.*, 2011a). La hiperproducción de KstR se llevó a cabo a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3) que portaban la construcción pET6042 que es capaz de producir la proteína de fusión KstR con un *tag* de histidinas bajo el control de un promotor inducible por IPTG (Fig. 33A). Las condiciones de inducción empleadas fueron las mismas que las descritas con anterioridad. Brevemente, la cepa se cultivó hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.6, y a continuación se añadió al medio de cultivo IPTG a una concentración final de 200  $\mu$ M, manteniendo el cultivo durante 3 h a 37 °C (Uhía *et al.*, 2011a). Sin embargo, las condiciones de purificación fueron ligeramente modificadas con el objetivo de mejorar el rendimiento. La proteína de fusión fue purificada a homogeneidad electroforética mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas de níquel-sefarosa (véase apartado XX de la sección Materiales y Métodos).

Como se observa en el análisis mediante SDS-PAGE que se muestra en la figura 33B, la proteína KstR eluye a una concentración de 150 mM de imidazol y se localiza por debajo del marcador de peso molecular de 31 kDa, lo cual es consistente con el tamaño estimado de 25.7 kDa de la proteína KstR fusionada al *tag* de histidinas. La concentración de la proteína KstR purificada se determinó mediante espectrofotometría teniendo en cuenta un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 18450  $M^{-1}cm^{-1}$  calculado de acuerdo a su composición. El rendimiento obtenido con las condiciones de hiperproducción y purificación establecidas fue de 20-30 mg de proteína por litro de cultivo.



**Figura 33. Clonación y hiperproducción de la proteína KstR de *M. smegmatis*.** **(A)** Esquema del plásmido pET6042 empleado para la hiperproducción de la proteína KstR. Este plásmido contiene el gen de resistencia a kanamicina (flecha verde) y el gen que codifica para el represor LacI (flecha azul). El gen *MSMEG\_6042* (KstR) (flecha roja) se encuentra fusionado a una secuencia que codifica un “tag” de 6 histidinas en su extremo 3’ y su expresión está mediada por el promotor T7 ( $P_{T7}$ ). La presencia del gen *lacI* y de su correspondiente región operadora ( $O_{lac}$ ) permite controlar la expresión de la proteína mediante la adición de IPTG. El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción. **(B)** Análisis mediante SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas durante la purificación de KstR-His. Calle 1, fracción no soluble del extracto proteico de *E. coli* BL21 (DE3) (pET6042); calle 2, marcadores de peso molecular (en el margen derecho se detallan los pesos moleculares en kDa); calles 3-4, lavados con 5 mM de imidazol; calles 5-6, lavados con 50 mM de imidazol; calle 7, elución con 150 mM de imidazol; calle 8, elución con 500 mM de imidazol; calle 9, marcadores de peso molecular. La flecha indica la posición de la proteína KstR purificada.

## 2.3. Estudio de las interacciones KstR-DNA

### 2.3.1. Estudios *in vitro* de la interacción de la proteína KstR con el promotor $P_{5228}$

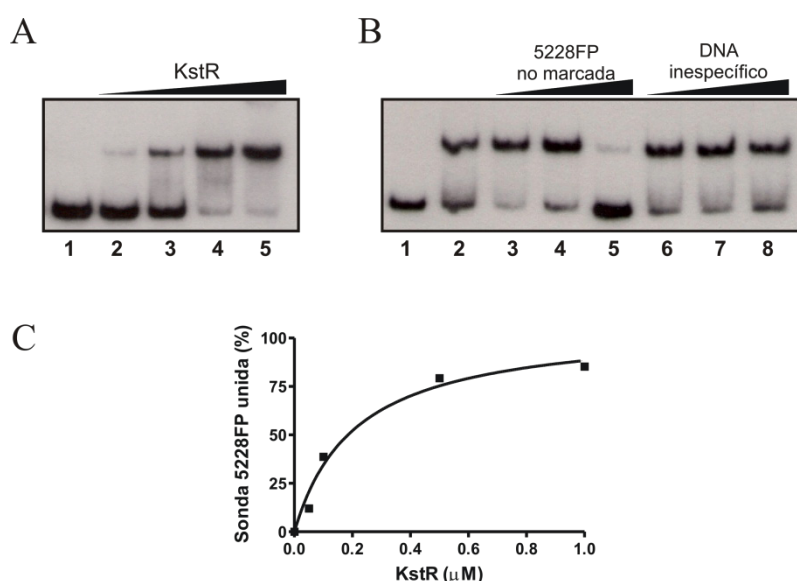
Tal y como se ha comentado, el promotor  $P_{5228}$  ha sido previamente caracterizado (Uhía *et al.*, 2011a). Este promotor regula la expresión del gen *MSMEG\_5228*, que codifica una enzima con actividad 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa, responsable del primer paso de degradación del colesterol en *M. smegmatis*. La transcripción de este gen comienza en el codón de inicio de la traducción (ATG), generándose un transcrito típicamente denominado *leaderless*, es

## Resultados

decir, un mRNA que carece de la región 5' no traducida (5'UTR) que normalmente contiene la secuencia de Shine-Dalgarno (Moll *et al.*, 2002). Uhía *et al.* (2011) demostraron que el represor KstR se une específicamente a la región promotora  $P_{5228}$ . Esta región contiene la secuencia palindrómica AACTGGAACGTGTTTCAGTT correspondiente a la caja operadora de KstR, que está localizada entre las cajas -10 y -35 del promotor  $P_{5228}$ , lo cual sugiere que la unión de KstR al operador impediría la unión de la RNA polimerasa y con ello el inicio de la transcripción.

Para comprobar que la proteína KstR purificada en este trabajo era funcional se realizaron ensayos de retardo en gel empleando la sonda 5228FP que contiene la región promotora  $P_{5228}$  (Uhía *et al.*, 2011a) tal y como se describe en el apartado XX de Materiales y Métodos. Como se muestra en la figura 34A, la proteína KstR fue capaz de unirse a la sonda y retrasar su migración en gel al formarse el complejo 5228FP-KstR. El porcentaje de sonda unida a KstR se calculó mediante densitometrado de las bandas observadas. La representación de estos valores frente a la concentración de proteína utilizada en cada caso se ajustó a la ecuación de una hipérbola considerando un único sitio de unión entre proteína y DNA (Fig. 34C). De este ajuste se estimó que la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de formación del complejo 5228FP-KstR es de  $0.21 \pm 0.07 \mu\text{M}$ .

La especificidad de la interacción 5228FP-KstR fue determinada mediante experimentos de competición con concentraciones crecientes de sonda 5228FP no marcada radiativamente y DNA inespecífico de esperma de salmón (Fig. 34B). Un exceso de sonda 5228FP no marcada compite con la sonda marcada por unirse a la proteína KstR y produce la liberación de ésta del complejo 5228FP-KstR (Fig. 34B, calles 3-5). Sin embargo la adición de DNA inespecífico de esperma de salmón no produce ningún efecto en la unión (Fig. 34B, calles 6-8), confirmando así la especificidad de la interacción entre KstR y la región promotora  $P_{5228}$ .



**Figura 34. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor  $P_{5228}$ .** (A) Ensayo de retardo en gel de la proteína KstR con la sonda 5228FP (0.5 nM). Las concentraciones de KstR probadas fueron: calle 1, 0 nM; calle 2, 50 nM; calle 3, 100 nM; calle 4, 500 nM; calle 5, 1  $\mu$ M. (B) Ensayo de retardo en gel de la proteína KstR (calle 1, 0 nM; calles 2-8, 500 nM) con la sonda 5228FP (0.5 nM) en presencia de concentraciones crecientes de sonda 5228FP no marcada radiactivamente (4, 40 y 400 nM, calles 3-5 respectivamente) y DNA inespecífico de esperma de salmón (0.5, 1 y 2  $\mu$ g, calles 6-8 respectivamente). (C) Representación gráfica de los porcentajes de sonda unida al complejo KstR-DNA para cada concentración de proteína. El ajuste de los datos a la ecuación de una hipérbola permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de formación del complejo 5228FP-KstR.

### 2.3.2. Estudio *in vitro* del efecto represor del regulador KstR sobre la transcripción

Una vez comprobado que la proteína KstR purificada interaccionaba con el promotor  $P_{5228}$ , el siguiente objetivo planteado consistió en analizar el efecto represor del regulador KstR sobre la transcripción. Para ello se clonó la región del promotor  $P_{5228}$  en el vector pJCD01, que contiene un sitio múltiple de clonación (derivado del vector



## Resultados

pUC19) flanqueado en sus extremos 5' y 3' por los terminadores divergentes *rpoCT* y *rrnBT1T2*, respectivamente (Marschall *et al.*, 1998) (Tabla 2 de Materiales y Métodos). El plásmido resultante, pJCD5228, se empleó como molde para la realización de experimentos de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa de *E. coli*. Sin embargo, debido a las grandes diferencias entre las cajas -35 y -10 de los promotores de *E. coli* y de *M. smegmatis*, no se observó la aparición de ningún transcrito que pudiera deberse a la acción del promotor *P<sub>5228</sub>*. Solamente se observó el transcrito control generado a partir de un promotor típico de *E. coli*. Este resultado confirmaba que la polimerasa de *E. coli* había funcionado correctamente pero no era efectiva sobre el promotor *P<sub>5228</sub>*. Debido a que no se dispone comercialmente de RNA polimerasa de *M. smegmatis* y a la dificultad para que la RNA polimerasa de *E. coli* reconozca eficazmente los promotores de *M. smegmatis*, se planteó la posibilidad de diseñar un promotor artificial que portara las cajas -35 y -10 consenso de *E. coli*, pero a su vez contuviera la región de reconocimiento del represor KstR.

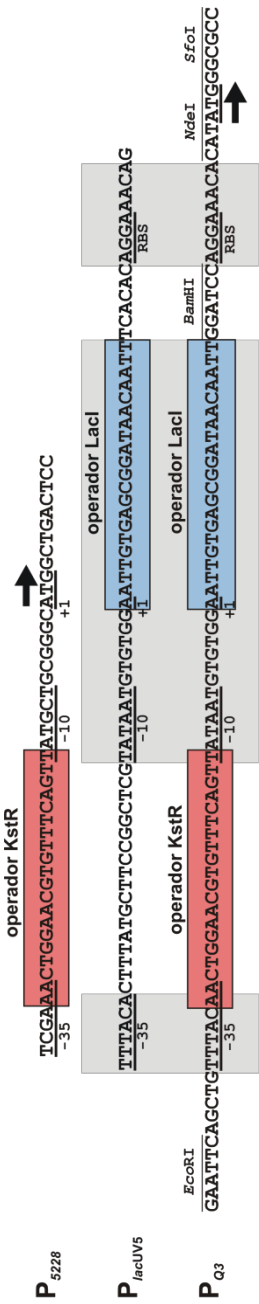
### 2.3.2.1. Diseño y clonación del promotor artificial *P<sub>Q3</sub>*

Ante la imposibilidad de realizar ensayos de transcripción *in vitro* con el promotor nativo *P<sub>5228</sub>*, se decidió construir un promotor artificial al que se denominó *P<sub>Q3</sub>*. El promotor *P<sub>Q3</sub>* se diseñó utilizando como base la secuencia del promotor *P<sub>lacUV5</sub>* de *E. coli*, una versión mutada del promotor *P<sub>lac</sub>* que presenta una modificación en la caja -35 (TTTACA en lugar de TTGACA) y cuya actividad basal es significativamente menos sensible a los niveles intracelulares de cAMP (Siebenlist, 1980). Como se ha comentado anteriormente, estudios previos demostraron que el promotor *P<sub>5228</sub>* contiene la caja operadora de unión al represor KstR entre las cajas -35 y -10 (Uhía *et al.*, 2011a). Puesto que es el único promotor regulado por KstR caracterizado hasta el momento, se decidió mantener esta misma localización de la caja operadora en el promotor artificial *P<sub>Q3</sub>*. Así, la secuencia comprendida entre las cajas -35 y -10 del promotor *P<sub>lacUV5</sub>* se sustituyó por la secuencia operadora de KstR presente en el promotor *P<sub>5228</sub>* (Fig. 35). Las dianas de restricción *EcoRI* y *SfoI* se añadieron a los extremos 5' y 3'

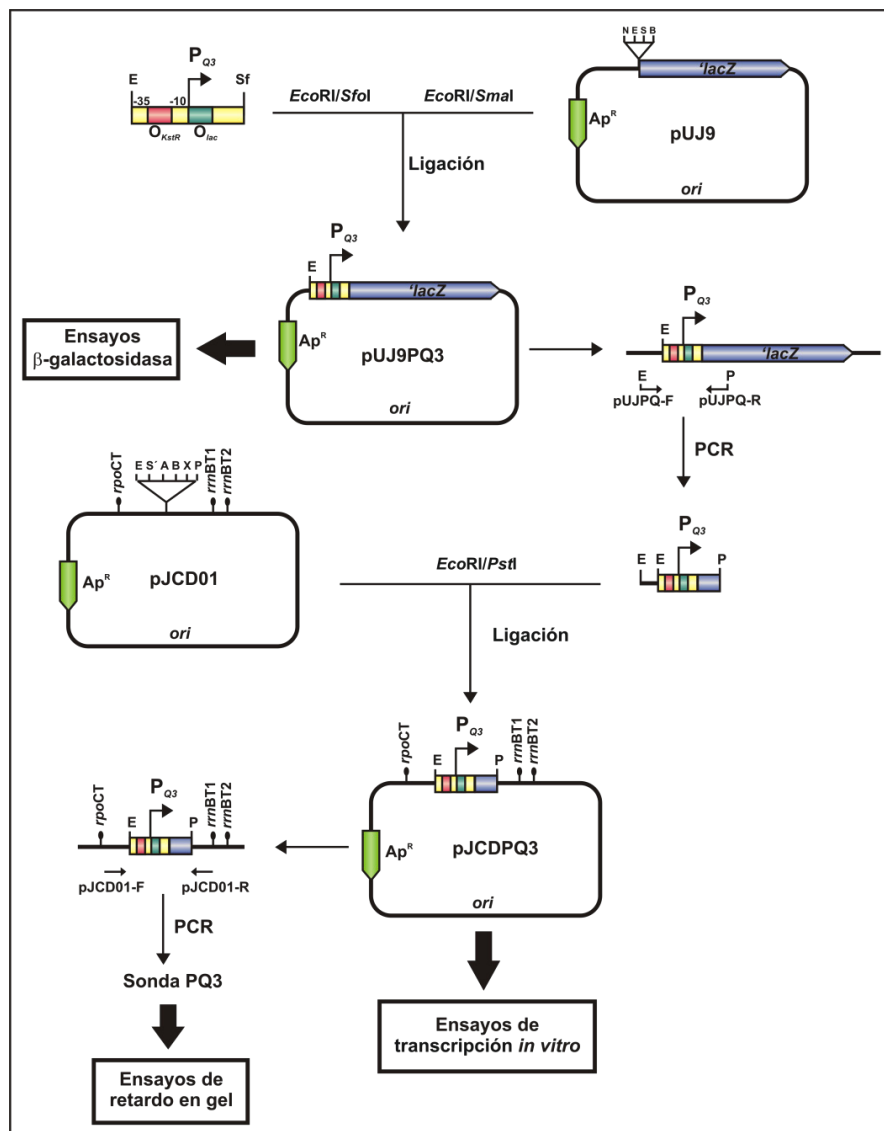
respectivamente para facilitar la clonación del fragmento en el vector pUJ9 (comentado más adelante). El resto de la secuencia del promotor  $P_{lacUV5}$  se mantuvo en el promotor sintético, incluida la secuencia correspondiente a la región operadora de LacI. La única modificación introducida fue la sustitución de las 6 pb comprendidas entre la región operadora del LacI y la secuencia Shine-Dalgarno por la diana de restricción *Bam*HI, que posibilita la realización de una fusión transcripcional con el gen marcador *lacZ*. La diana de restricción *Nde*I (que porta un codón de inicio de la traducción) incluida delante de la diana *Sfo*I permite la realización de fusiones traduccionales con *lacZ*.

El fragmento diseñado de 94 pb fue sintetizado por la compañía GeneScript (Hong Kong) y tras su digestión con las enzimas de restricción *Eco*RI-*Sfo*I se clonó en el plásmido pUJ9 (de Lorenzo *et al.*, 1990) entre las dianas *Eco*RI y *Sma*I (esta última junto con la diana *Sfo*I, generan extremos romos y por tanto son compatibles). El vector pUJ9 presenta un sitio múltiple de clonación fusionado al décimo codón (GTG) del marco de lectura del gen *lacZ*, permitiendo la construcción de fusiones traduccionales con dicho gen. El plásmido resultante pUJ9PQ3, que contiene por tanto el promotor sintético fusionado traduccionalmente al gen *lacZ* (Fig. 36), se empleó para la realización de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa que se detallan en el apartado XX.

El promotor  $P_{Q3}$  fue clonado también en el plásmido pJCD01, con el fin de utilizarlo en experimentos de transcripción *in vitro*. Para ello, el promotor sintético se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos pUJPQ-F y pUJPQ-R (Tabla 3 de Materiales y Métodos) y tomando como molde el plásmido pUJ9PQ3. El producto de PCR se digirió con *Eco*RI y *Pst*I (incluidas en los cebadores) y posteriormente se ligó al plásmido pJCD01 digerido a su vez con las mismas enzimas. El plásmido resultante pJCDPQ3 (Fig. 36) se empleó posteriormente como molde para la amplificación de la sonda PQ3, utilizada en los ensayos de retardo en gel, y en los experimentos de transcripción *in vitro*.



**Figura 35. Diseño del promotor quimérico  $P_{Q3}$ .** Las secuencias de los promotores  $P_{5228}$  (*M. smegmatis*),  $P_{lacUV5}$  (*E. coli*) y  $P_{Q3}$  (promotor quimérico) aparecen alineadas. Las secuencias correspondientes a las cajas -10 y -35, el sitio de inicio de la transcripción (+1), el codón de inicio de la traducción (ATG) y la secuencia de unión del ribosoma (RBS) o secuencia Shine-Dalgarno aparecen subrayadas. Las flechas indican el sentido de inicio de la traducción, que en el caso del promotor  $P_{5228}$  coincide con el sitio de inicio de la transcripción. El recuadro rojo indica la secuencia correspondiente a la caja operadora del represor KstR. El recuadro azul engloba la región operadora del represor LacI presente en el promotor  $P_{lacUV5}$  y que se mantiene intacta en el promotor sintético  $P_{Q3}$ . Las zonas sombreadas en gris indican las regiones conservadas entre los promotores  $P_{lacUV5}$  y  $P_{Q3}$ . En la parte superior de la secuencia del promotor  $P_{Q3}$  se indican las dianas de restricción incluídas para permitir la clonación del mismo así como la construcción de fusiones transcripcionales y traducionales con el gen marcador *lacZ*.



**Figura 36. Construcción de los plásmidos pUJ9PQ3 y pJCDPQ3.** La secuencia correspondiente al promotor PQ3 aparece representada en amarillo. Las regiones operatorias de los represores KstR ( $O_{KstR}$ ) y LacI ( $O_{lac}$ ) se señalan en rojo y verde respectivamente. El plásmido pUJ9 contiene el gen  $lacZ'$  truncado en su extremo 5' (flecha azul) y el gen de resistencia a ampicilina (flecha verde). El plásmido pJCD01 contiene también el gen de resistencia a ampicilina (flecha verde) y flanqueando el sitio múltiple de clonación en sus extremos 5' y 3'

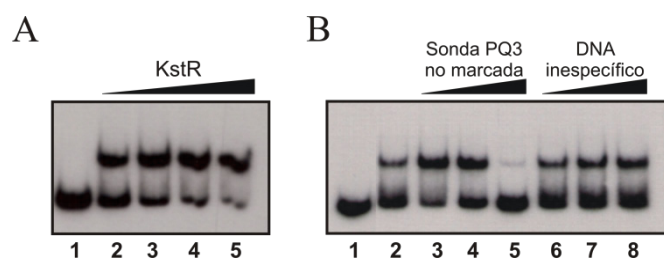
## Resultados

presenta los terminadores divergentes *rpoCT* y *rrnBT1T2* respectivamente. E: *EcoRI*; Sf: *SfoI*; N: *NotI*; S: *SmaI*; B: *BamHI*; P: *PstI*; S': *SacI*; A: *AvaI*; X: *XbaI*. Por simplificar sólo se han incluido las dianas más relevantes en el sitio múltiple de clonaje del plásmido pJCD01.

### 2.3.2.2. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor P<sub>Q3</sub>

Para comprobar si el represor KstR era capaz de reconocer la región operadora que porta el promotor P<sub>Q3</sub> se realizaron ensayos de retardo en gel con una sonda de DNA marcada radiactivamente que contenía la secuencia completa de dicho promotor. Esta sonda, denominada sonda PQ3, se sintetizó mediante PCR utilizando como molde el plásmido pJCDPQ3 (Fig. 36) y los oligonucleótidos pJCD01-F y pJCD01-R. Como puede observarse en la figura 37A, la adición de concentraciones crecientes de KstR (entre 100 nM y 1 µM) produce un retraso en la migración en gel de la sonda PQ3, debido a la formación del complejo PQ3-KstR. Sin embargo, incluso con elevadas concentraciones de proteína (1 µM) sigue observándose una pequeña cantidad de sonda no unida, lo cual podría estar indicando que, aunque la proteína KstR es capaz de interaccionar con el promotor PQ3, esta unión es menos eficaz que en el caso del promotor nativo P<sub>5228</sub>. A pesar de que la región operadora de ambos promotores es la misma, las secuencias adyacentes a ésta son diferentes, sugiriendo que estas tienen alguna relevancia en el proceso de reconocimiento del DNA.

Además, la interacción PQ3-KstR es específica ya que un exceso de sonda PQ3 no marcada radiactivamente compite con la sonda marcada y provoca la liberación del complejo (Fig. 37B, calles 3-5), mientras que la adición de DNA inespecífico de espermatozoos de salmón no (Fig. 37B, calles 6-8).



**Figura 37. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor  $P_{Q3}$ .** (A) Ensayo de retardo en gel de la proteína KstR con la sonda PQ3 (0.5 nM). Las concentraciones de KstR probadas fueron: calle 1, 0 nM; calle 2, 100 nM; calle 3, 250 nM; calle 4, 500 nM; calle 5, 1 µM; (B) Ensayo de retardo en gel de la proteína KstR (calle 1, 0 nM; calles 2-8, 500 nM) con la sonda PQ3 (0.5 nM) en presencia de concentraciones crecientes de sonda PQ3 no marcada radiactivamente (4, 40 y 400 nM, calles 3-5 respectivamente) y DNA inespecífico de esperma de salmón (0.5, 1 y 2 µg, calles 6-8 respectivamente).

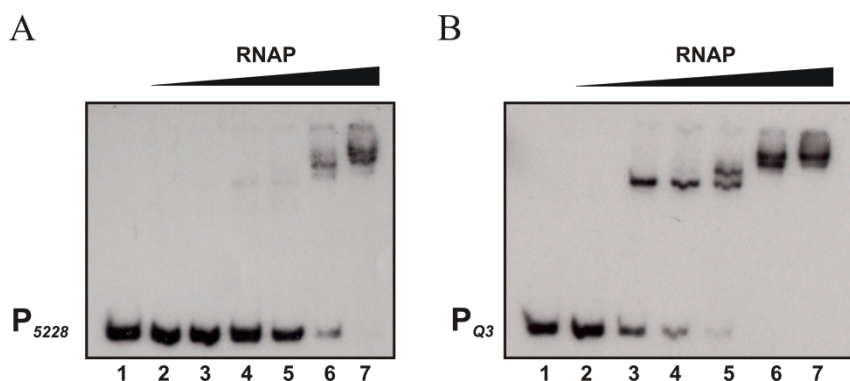
### 2.3.2.3. Análisis del efecto represor de KstR sobre la transcripción mediada por el promotor $P_{Q3}$

Una vez comprobado que el promotor artificial  $P_{Q3}$  era reconocido por el represor KstR, se procedió a analizar si la RNAP de *E. coli* interaccionaba con el mismo y era capaz de iniciar la transcripción a partir de éste.

En primer lugar se realizaron ensayos de retardo en gel de la RNAP de *E. coli* con la sonda PQ3 marcada radiactivamente. Con el objetivo de comparar la capacidad de unión de la RNAP a este promotor y al promotor nativo,  $P_{5228}$  este mismo experimento se llevó también a cabo con la sonda 5228FP. Como se observa en la figura 38, la RNAP se une más eficazmente a la sonda de DNA que porta el promotor sintético  $P_{Q3}$ , ya que con concentraciones de 10 nM de RNAP ya se produce la formación de los complejos PQ3-RNAP (Fig. 38B, calle 3), consiguiéndose el retardo completo de la sonda con concentraciones superiores a 60 nM (Fig. 38B, calle 5). Sin embargo, en el caso de la sonda 5228FP, la formación del complejo 5228FP-RNAP sólo es visible a partir de concentraciones de RNAP de 100 nM. Estas diferencias sustanciales en la

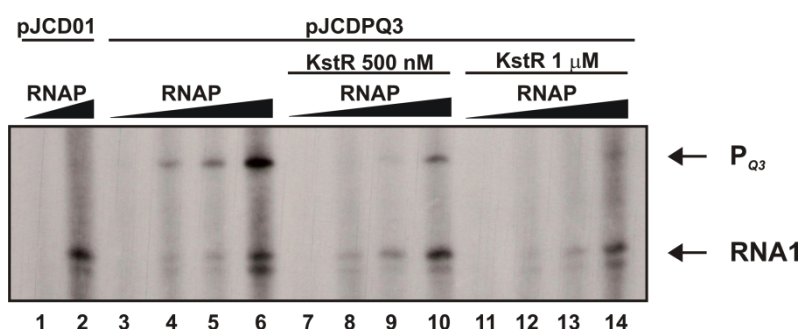
## Resultados

interacción de los dos promotores con la RNAP ponen de manifiesto la preferencia de ésta por los promotores de *E. coli* y explican el hecho de que no se obtuvieran resultados positivos en los ensayos de transcripción *in vitro* realizados con el promotor nativo  $P_{5228}$ .



**Figura 38. Estudio de la interacción de la proteína RNAP de *E. coli* con los promotores  $P_{5228}$  y  $P_{Q3}$ .** Ensayos de retardo en gel realizados con las sondas 5228FP (A) y PQ3 (B) en presencia de concentraciones crecientes de RNAP: 0, 3, 10, 30, 60, 100 y 150 nM.

Tras demostrar su interacción con la RNAP, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* utilizando la RNAP de *E. coli* y la proteína KstR purificada. Como molde para la transcripción se utilizaron los plásmidos pJCD01 y pJCDPQ3, que contiene el promotor  $P_{Q3}$  flanqueado en sus extremos 5' y 3' por los terminadores divergentes *rpoCT* y *rrnBT1T2* respectivamente (Fig. 36). Se probaron concentraciones crecientes de RNAP (10-40 nM), y como se observa en la figura 39, a partir de 20 nM de ésta empiezan a aparecer los transcritos esperados: el transcrito control RNA1 de 107-108 nt y el transcrito debido al promotor  $P_{Q3}$  de 152 nt (Fig. 39, calle 4). La concentración óptima de RNAP para estos ensayos de transcripción *in vitro* se estableció en 40 nM. Cuando el ensayo se realizó en presencia de KstR (0.5 y 1  $\mu$ M), la transcripción desde el promotor  $P_{Q3}$  se inhibe (Fig. 39, calles 8-10 y 12-14), confirmando que KstR es capaz de actuar como represor *in vitro*.



**Figura 39. Estudio de la transcripción mediada por el promotor sintético  $P_{Q3}$  y análisis *in vitro* del efecto represor de KstR.** Ensayo de transcripción *in vitro* (*multiple round*) a partir de los plásmidos pJCD01 (calles 1-2) y pJCDPQ3 (calles 3-14) en presencia de concentraciones crecientes de RNAP de *E. coli*: 10nM (calles 1, 3, 7 y 11), 20 nM (calles 4, 8 y 12), 30 nM (calles 5, 9 y 13) y 40 nM (calles 2, 6, 10 y 14). Cuando se indica se añadió el represor KstR a concentraciones de 500 nM (calles 7-10) y 1  $\mu$ M (calles 11-14). Las flechas indican los transcritos debidos al promotor  $P_{Q3}$  (152 nt) y al transcrito control (107-108 nt) del plásmido pJCD01.

Estos resultados junto con los ensayos de retardo en gel mostrados en el apartado anterior permiten confirmar la validez del promotor  $P_{Q3}$  como una herramienta útil para estudiar la regulación transcripcional mediada por KstR.

#### 2.4. Identificación del inductor específico del represor KstR

En los últimos años se han realizado varios experimentos *in vivo* de *microarrays* y RT-PCR en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en los que se ha demostrado la inducción de los genes regulados por KstR en presencia de colesterol (Kendall *et al.*, 2007; Nesbitt *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2011; Uhía *et al.*, 2012). Sin embargo, en ningún caso ha sido posible determinar la interacción de este compuesto con el represor KstR (Uhía *et al.*, 2011a). El efecto del colesterol y de la colesteno ha sido probado



## Resultados

mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa realizados con la cepa de *E. coli* MC4100, portadora de la fusión traduccional entre el promotor  $P_{5228}$  de *M. smegmatis* y el gen *lacZ* ( $P_{5228} :: lacZ$ ) en presencia del plásmido pIZ16042, que contiene el represor KstR (*MSMEG\_6042*). La adición al medio de cultivo de colesterol o colesteno no inhibía la represión de la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa mediada por KstR (Uhía *et al.*, 2011a). El hecho de que no fuera posible detectar ningún efecto en los experimentos *in vivo* en un sistema heterólogo podría ser inicialmente atribuido al hecho de que muy probablemente estos compuestos no pueden ser transportados a través de la membrana de *E. coli*. Sin embargo, en este mismo trabajo se realizaron experimentos de retardo en gel con la proteína KstR y la sonda 5228FP marcada radiactivamente en los que el complejo DNA-KstR no se veía afectado por la presencia de colesterol o colesteno. Puesto que en estos experimentos *in vitro* no hay implicación ninguna de los mecanismos de transporte, cabe la posibilidad de que los resultados negativos en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa puedan deberse a que estos compuestos no sean los verdaderos inductores del sistema.

La búsqueda e identificación de este(os) compuesto(s) inductor(es), así como la caracterización de la interacción entre éste(os) con KstR y su efecto en el mecanismo de regulación transcripcional se detallan ampliamente en este apartado.

### 2.4.1. Identificación de posibles inductores mediante dicroísmo circular

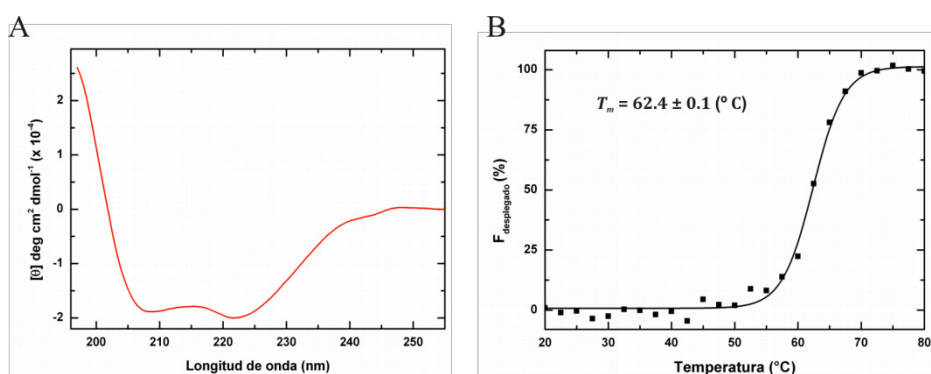
Como los ensayos de retardo en gel realizados no mostraron resultados positivos (Uhía *et al.*, 2011a), se optó por utilizar otras técnicas más sencillas y al mismo tiempo más poderosas que permitieran estudiar la interacción del regulador KstR y sus posibles moléculas inductoras. La unión de un ligando a una proteína puede inducir cambios en la estructura secundaria y/o terciaria de la misma, y en este sentido el dicroísmo circular, CD, constituye una herramienta muy sensible que permite analizar la estructura de las proteínas en solución y por tanto detectar los cambios producidos debido a la unión de los ligandos (Kelly *et al.*, 2005).

El CD es una técnica espectroscópica de absorción basada en la interacción de ciertas moléculas con la luz polarizada circularmente. Se define como la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y la absorción de luz polarizada circularmente a la derecha por una muestra que exhibe asimetría molecular. Los espectros de dicroísmo circular de las proteínas se obtienen generalmente en las regiones del UV cercano (260 a 320 nm) y lejano (180 a 260 nm) de la radiación electromagnética. Los espectros en la región del UV cercano son un reflejo de la estructura terciaria de la proteína, mientras que las señales en el UV lejano se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria (  $\alpha$ -hélice, lámina  $\beta$ , giros  $\beta$  y otros tipos estructurales). (Blauer, 1974; Greenfield, 1975)

Otra de las aplicaciones del CD es el estudio de la estabilidad de las proteínas. La pérdida de señal de dicroísmo en presencia de agentes desnaturizantes o debido a un incremento de la temperatura proporciona información sobre el estado de plegamiento de la proteína. La unión de ligandos puede modificar dicho plegamiento y por tanto cambiar el perfil de desnaturización de la proteína (Kelly *et al.*, 2005).

A la vista del planeamiento anterior, la búsqueda de las moléculas inductoras de KstR se abordó mediante el empleo de técnicas de CD. En primer lugar se realizó un espectro de CD de la proteína en el UV lejano de la proteína en ausencia de ligando, con el objetivo de obtener información sobre el contenido de estructura secundaria de la misma. En la figura 40A se muestra este espectro que revela existencia de dos mínimos relativos a 208 y 222 nm respectivamente, lo que indica que se trata de una proteína con alto contenido en  $\alpha$ -hélice (Woody, 1995; Kelly y Price, 2000). A continuación se analizó el perfil de desnaturización térmica en ausencia de ligando. Para ello, las muestras se sometieron a un calentamiento progresivo (20 °C/h) y se siguió la señal de CD a 222 nm, ya que es a esta longitud de onda donde las diferencias en la señal de CD entre el estado nativo y desplegado de la proteína son más acusadas. En ausencia de ligandos KstR mostró un perfil de desnaturización consistente con dos estados, plegado y desplegado y una temperatura de fusión ( $T_m$ ) de  $62.4 \pm 0.1$  °C (Fig. 40B).

## Resultados

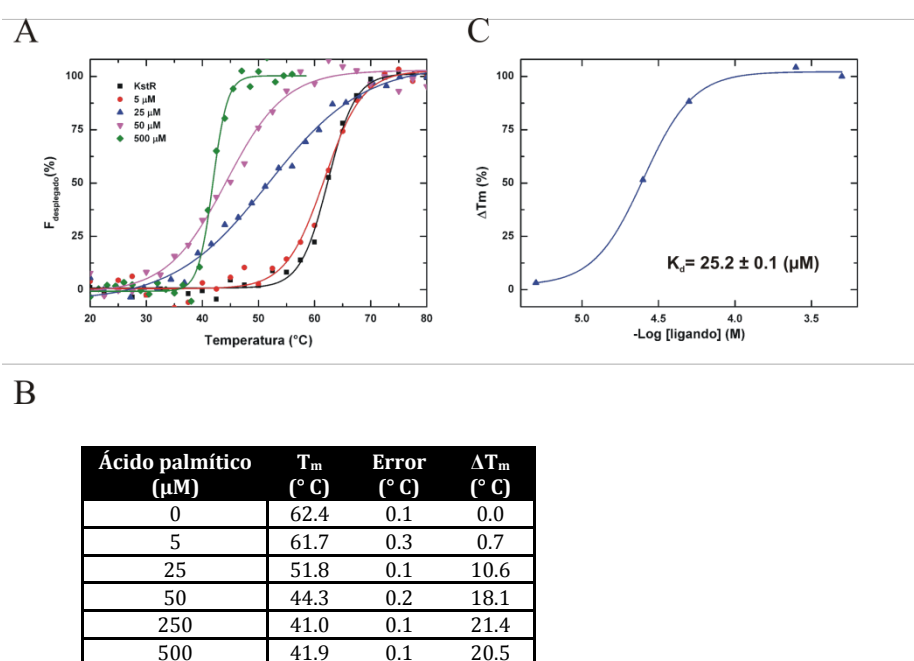


**Figura 40. Caracterización del represor KstR mediante CD en el UV lejano. (A)** Espectro de CD en el UV lejano de la proteína KstR (3  $\mu$ M) en ausencia de ligando. **(B)** Perfil de desnaturalización térmica de KstR (4  $\mu$ M) seguido mediante CD a 222 nm. En el gráfico se muestra el valor estimado de  $T_m$  de la proteína KstR en ausencia de ligando.

Como se ha comentado al comienzo del apartado 2.3., la degradación del colesterol durante la fase crónica de la infección es clave para la supervivencia de *M. tuberculosis*, sin embargo, no parece ser crucial durante las etapas tempranas. En numerosos trabajos ha sido descrito que, durante estas primeras fases de la infección, *M. tuberculosis* utiliza como fuente de carbono preferencial los ácidos grasos de las células infectadas en lugar de carbohidratos (Segal and Bloch, 1956), lo que explica que durante el crecimiento intrafagosomal se induzcan genes que están directamente relacionados con procesos de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (Schnappinger *et al.*, 2003). Se ha propuesto que algunos de estos genes están regulados por KstR y también aparecen inducidos cuando el microorganismo crece en presencia de ácido palmítico (Schnappinger *et al.*, 2003). El hecho de que algunos de estos genes estuvieran regulados por KstR llevó a plantear la posibilidad de que el ácido palmítico pudiera actuar como un posible inductor de este represor.

Para comprobar si el ácido palmítico era capaz de interaccionar con el represor, se analizó el efecto de este compuesto en procesos de desnaturalización

térmica de KstR mediante seguimiento de la señal de CD a 222 nm. Como se muestra en la figura 41A, según se incrementa la concentración de compuesto (5-500  $\mu\text{M}$ ) se observa una pérdida de estabilidad térmica, alcanzándose una reducción de  $T_m$  de hasta 20  $^{\circ}\text{C}$  cuando se alcanzan concentraciones saturantes ( $> 250 \mu\text{M}$ ). Esta reducción de la estabilidad térmica es una clara indicación de los cambios conformacionales que se producen tras la unión de ácido palmítico a KstR. A partir de los valores de  $T_m$  a cada concentración de ácido palmítico (Fig. 41B) se estimó que la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para el ácido palmítico es de  $25.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$  (Fig. 41C)



**Figura 41. Estudio de la estabilidad térmica de KstR en presencia de ácido palmítico mediante CD en el UV-lejano. (A)** Perfiles de desnaturalización térmica del represor KstR en presencia de concentraciones crecientes de ácido palmítico. La concentración de KstR empleada fue de 4  $\mu\text{M}$  y las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7.5 y 150 mM de KCl. **(B)** Estimación del valor de  $T_m$  de KstR para cada concentración de ácido palmítico. El valor de  $\Delta T_m$  corresponde a la reducción de la  $T_m$  con respecto a la proteína en ausencia de compuesto. **(C)** Representación gráfica de los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos para cada

## Resultados

concentración de compuesto. El ajuste de los datos a una ecuación sigmoideal permite la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para el ácido palmítico.

Para comprobar si este efecto era específico del ácido palmítico, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica seguida por CD en presencia de otros ácidos grasos con diferente longitud de cadena, tales como el ácido caprílico (octanoico) y el ácido oleico, así como los alcoholes correspondientes (palmitoil alcohol, oleil alcohol y 1-octanol). También se analizó el *n*-decano que, al igual que ocurre con la cadena lateral del colesterol y la colestenoona, carece de grupo funcional (Tabla 7). La estimación de los valores de  $T_m$  del represor KstR en presencia de concentraciones saturantes (0.5 mM) de cada uno de estos compuestos se muestra en la tabla 8.

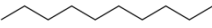
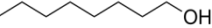
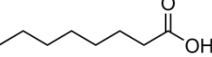
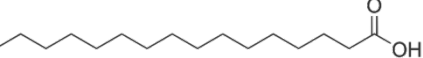
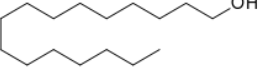
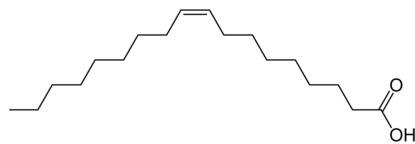
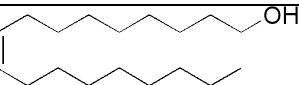
NOMBRE	FÓRMULA MOLECULAR	ESTRUCTURA QUÍMICA
Decano	$C_{10}H_{22}$	
1-Octanol	$C_8H_{18}O$	
Ácido caprílico	$C_8H_{16}O_2$	
Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	
Palmitoil alcohol	$C_{16}H_{34}O$	
Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	
Oleil alcohol	$C_{18}H_{36}O$	

Tabla 7. Compuestos estudiados mediante dicroísmo circular.

Sólo en el caso del ácido oleico se observó un efecto similar al del ácido palmítico sobre la estabilidad térmica de KstR, con una reducción de  $T_m$  de 13.9 °C (tabla 8). Ninguno de los otros compuestos probados (ácido octanoico, alcoholes y decano) presentó ningún efecto sobre la estabilidad térmica de KstR, lo que sugiere que es requisito fundamental la existencia de una cadena hidrofóbica larga y un grupo carboxilo para inducir cambios conformacionales que conlleven una reducción de la estabilidad térmica del regulador KstR.

Compuesto (0.5 mM)	$T_m$ (° C)	Error (° C)	$\Delta T_m$ (° C)
----	62.4	0.1	----
Ácido palmítico	41.9	0.1	20.5
Ácido oleico	48.5	0.4	13.9
Ácido octanoico	60.5	0.3	1.9
Palmitoil alcohol	61.6	0.1	0.8
Oleil alcohol	61.7	0.0	0.7
Octanol	62.8	0.1	-0.4
Decano	63.7	0.2	-1.3

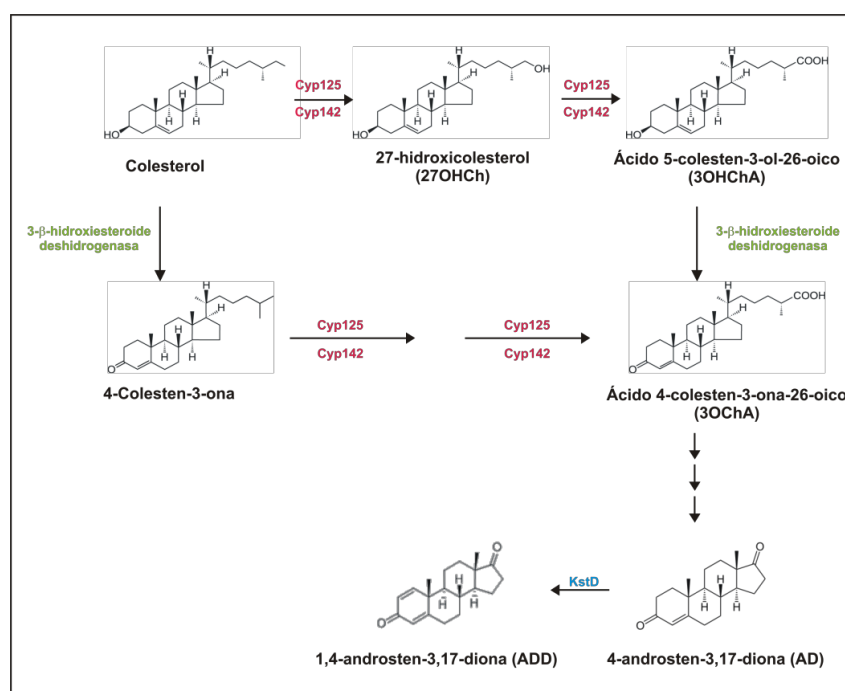
**Tabla 8. Estimación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de KstR en presencia de diferentes compuestos.**

La estimación del valor de  $T_m$  se realizó a partir de experimentos de desnaturalización térmica seguida mediante CD en el UV-lejano. La concentración de KstR empleada fue de 4  $\mu$ M. Los valores de la primera fila corresponden a la proteína en ausencia de ligando. El valor de  $\Delta T_m$  corresponde a la reducción de la  $T_m$  en cada caso con respecto a la proteína sin compuesto.

Como se ha demostrado en el capítulo 1 de Resultados y ha sido descrito en otros trabajos publicados recientemente (véase apartado XX de Introducción), la acción de los citocromos P450 CYP125 y CYP142 sobre el colesterol conlleva una primera hidroxilación del carbono C27 (o C26), formándose el compuesto 27-hidroxicoolesterol (27OHCh), seguida de un posterior proceso de oxidación por el que el grupo hidroxilo se transforma en un grupo carboxilo, originándose el ácido 5-colesten-3-ol-26-oico (30HChA). Si antes o después de que actúen los citocromos tiene lugar la oxidación en el carbono C3 realizada por la enzima 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Uhía *et al.*, 2011b), el producto final generado es el ácido 4-colesten-3-ona-26-oico (30ChA) (Fig.

## Resultados

42). Dada la alta similitud estructural de estos dos últimos compuestos con el ácido palmítico, la cadena lateral alifática en el C17 y el grupo carboxilo en el C26, se decidió comprobar el efecto de estos compuestos sobre la estabilidad térmica de KstR. Además de estos intermediarios se probaron también el 27OHCh, para investigar las posibles diferencias que pudieran surgir debidas a la existencia de un grupo hidroxilo en lugar de un grupo carboxilo, así como los compuestos 4-androsten-3,17-diona (AD) y 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD) que carecen de la cadena alifática (Fig. 42).



**Figura 42. Metabolitos intermediarios de la degradación del colesterol estudiados mediante dicroísmo circular.** Los compuestos probados fueron aquellos derivados de las dos primeras etapas de la degradación del colesterol, la oxidación en el carbono C3 realizada por la enzima 3-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa y las oxidaciones sucesivas realizadas por los citocromos P450 Cyp125 y Cyp142 en el carbono C27: colesterol, 4-colesten-3-ona (colesteno), 27-hidroxicolesterol, ácido 5-colesten-3-ol-26-oico y ácido 4-colesten-3-ona-26-oico. También fueron comprobados los compuestos 4-androsten-3,17-diona (AD) y 1,4-androstadien-3,17-diona (ADD), originados tras la completa degradación de la cadena lateral del colesterol.

De la misma manera que antes, a partir de experimentos de desnaturalización térmica seguida mediante CD, se estimó la  $T_m$  de la proteína en presencia de concentraciones saturantes (0.5 mM) de estos compuestos (Tabla 9). La adición de colesterol o 4-colesten-3-ona no supuso ningún cambio en la  $T_m$  de KstR, indicando una vez más que estos compuestos no son los verdaderos inductores. Sin embargo, los derivados ácidos 3OHChA y 3OChA disminuyeron la  $T_m$  de KstR unos 18 y 29 °C respectivamente, corroborando el hecho de que la existencia de la cadena alifática y el grupo carboxilo son imprescindibles en la interacción de las moléculas con el regulador KstR. Este resultado permitió proponer ambos intermediarios de la degradación del colesterol como posibles inductores de la ruta.

Compuesto (0.5 mM)	$T_m$ (° C)	Error (° C)	$\Delta T_m$ (° C)
----	62.4	0.1	----
Colesterol	63.3	0.1	-0.9
4-colesten-3-ona	65.5	0.1	-3.1
27-OHCh	63.7	0.1	-1.3
3OHChA	44.0	0.4	18.4
3OChA	33.2	0.8	29.2
AD	60.7	0.1	1.7
ADD	64.4	0.1	-2.0

**Tabla 9. Estimación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de KstR en presencia de diferentes compuestos intermediarios de la degradación del colesterol.** La estimación del valor de  $T_m$  se realizó a partir de experimentos de desnaturalización térmica seguida mediante CD en el UV lejano. La concentración de KstR empleada fue de 4  $\mu$ M. Los valores de la primera fila corresponden a la proteína en ausencia de ligando. El valor de  $\Delta T_m$  corresponde a la reducción de la  $T_m$  en cada caso con respecto a la proteína sin compuesto.

Tras comprobar que los compuestos 3OHChA y 3OChA tenían causaban un cambio de la estabilidad térmica de KstR, se llevaron a cabo experimentos de desnaturalización térmica con diferentes concentraciones de cada uno de ellos. El perfil de desnaturalización de KstR en presencia de 3OHChA (Fig. 43A) resultó ser muy similar al observado con el ácido palmítico (Fig. 41A), lo que indica la presencia de dos

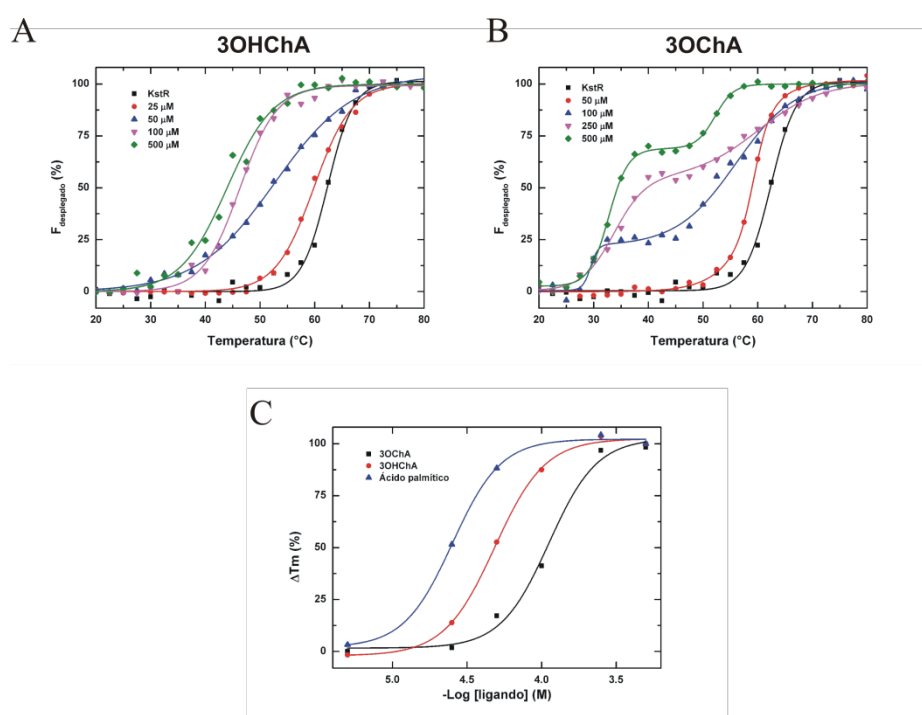


## Resultados

estados de la proteína, plegada y desplegada. Esto mismo ocurre a bajas concentraciones de 3OChA (<50  $\mu\text{M}$ ), sin embargo, a concentraciones más altas (> 100  $\mu\text{M}$ ) se observa un perfil de desnaturalización bimodal (Fig. 43B). Esto podría estar indicando la existencia de al menos tres estados, plegado, intermedio y desplegado. Este comportamiento bimodal podría estar sugiriendo que los cambios conformacionales inducidos por la interacción del ligando con la proteína KstR podrían afectar de manera diferente a los dos dominios de la proteína. A partir de los valores de  $T_m$  observados a cada concentración de compuesto (Tabla 10) se estimó que las constantes de disociación aparentes ( $K_d$ ) para los ácidos 3OHChA y 3OChA son  $49.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$  y  $114.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 43C).

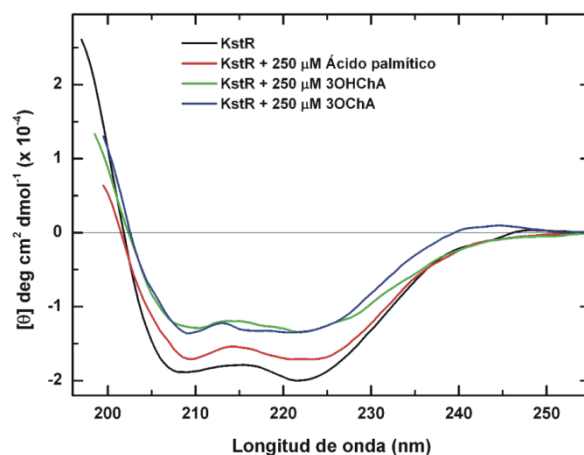
Compuesto	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	Error ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
3OHChA	0	62.4	0.1	0.0
	25	59.8	0.2	2.6
	50	52.7	0.3	9.7
	100	46.3	0.2	16.1
	500	44.0	0.4	18.4
3OChA	0	62.4	0.1	0.0
	50	57.3	0.7	5.1
	100	50.2	0.1	12.2
	250	33.7	0.5	28.7
	500	33.2	0.8	29.2

**Tabla 10. Estimación de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de KstR en presencia de concentraciones crecientes de 3OHChA y 3OChA.** La estimación del valor de  $T_m$  se realizó a partir de los experimentos de desnaturalización térmica que se representan en la figura 43. El valor de  $\Delta T_m$  corresponde a la reducción de la  $T_m$  en cada caso con respecto a la proteína sin ligando.



**Figura R43. Estudio de la estabilidad térmica de KstR mediante CD en el UV-lejano en presencia de 3OHChA y 3OChA.** Perfiles de desnaturalización térmica del represor KstR en presencia de concentraciones crecientes de 3OHChA **(A)** y 3OChA **(B)**. La concentración de KstR empleada fue de 4  $\mu\text{M}$  y las reacciones se llevaron a cabo en tampón fosfato potásico 20 mM a pH 7.5 y 150 mM de KCl. En las leyendas se indican las concentraciones de compuesto empleadas en cada caso. **(C)** Representación gráfica de los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos para cada concentración de compuesto. El ajuste de los datos a una ecuación sigmoideal permite la estimación de las constantes de disociación aparentes ( $K_d$ ) para el 3OHChA y el 3OChA. En el caso de 3OChA se emplearon los datos correspondientes a la primera transición. Se ha incluido también el ajuste realizado con los datos obtenidos con el palmítico para facilitar la comparación entre los tres compuestos.

A



B

Estructura secundaria	KstR	Ácido palmítico	3OHChA	3OChA
$\alpha$ -hélice	63.4	50.2	39.6	44.4
Lámina $\beta$ antiparalela	3.0	5.1	9.2	8.3
Lámina $\beta$ paralela	5.1	5.2	5.8	5.9
Giro $\beta$	12.3	14.8	14.6	14.0
No estructurada	20.5	24.9	27.5	27.0

**Figura 44. Determinación de la estructura secundaria de KstR mediante CD en el UV- lejano. (A)** Espectros de CD en el UV- lejano (195-255 nm) de KstR en ausencia de ligando (negro) y en presencia de 250  $\mu$ M de ácido palmítico (rojo), 3OHChA (verde) y 3OChA (azul). **(B)** Predicción del contenido de estructura secundaria de KstR en ausencia y presencia de ligando. El porcentaje correspondiente a cada tipo de estructura se calculó con el programa CDNN.

Con el propósito de comprobar si la unión de los ácidos palmítico, 3OHChA y 3OChA provocaban un reordenamiento de la estructura secundaria de KstR, se analizó el espectro de CD en el UV lejano de la proteína en presencia de estos compuestos (Fig. 44A). Como se comentó anteriormente, el espectro de KstR libre (Fig. 44A, línea negra)

revela que se trata de una proteína con elevado contenido en  $\alpha$ -hélice (62% según se estimó con el programa CDNN (Böhm *et al.*, 1992)). La adición de los ácidos palmítico (Fig. 44A, línea roja), 3OHChA (Fig. 44A, línea verde) o 3OChA (Fig. 44A, línea azul) en concentraciones saturantes (250  $\mu$ M) produjo una reducción de señal de CD que se traduce en una clara disminución del contenido en  $\alpha$ -hélice de la proteína hasta valores de 50, 40 y 44 % respectivamente (Fig. 44B). Esta reducción en el contenido en  $\alpha$ -hélice es consistente con la pérdida de estabilidad térmica observada en los experimentos de desnaturalización en presencia de éstos compuestos.

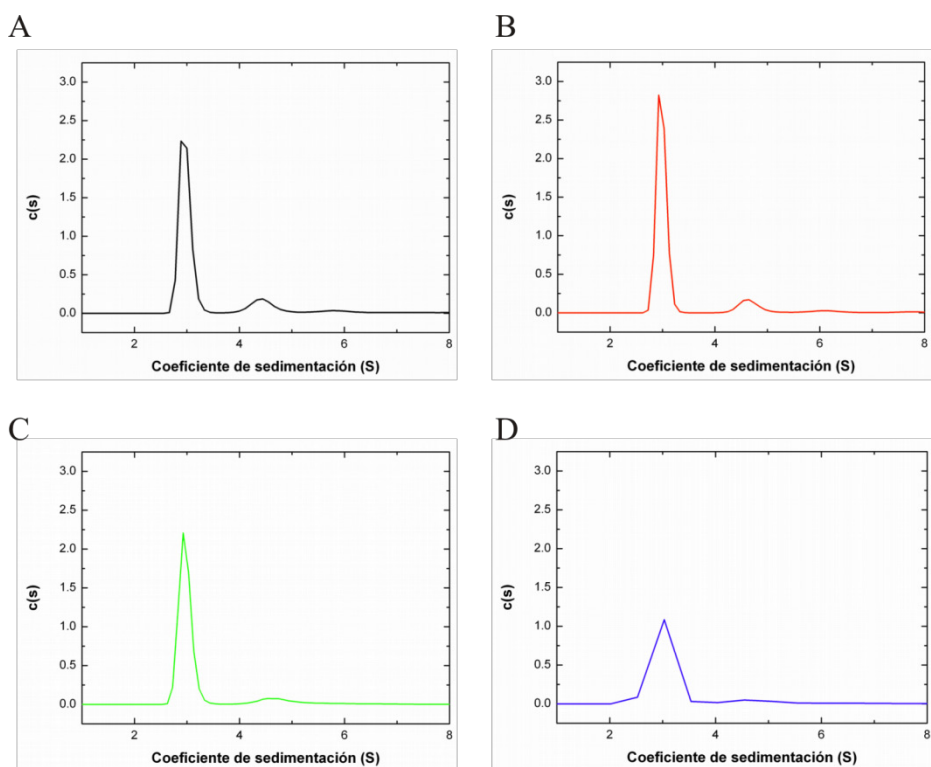
En resumen, el efecto de los compuestos ácidos que se producen en las primeras reacciones enzimáticas de la degradación del colesterol (3OHChA y 3OChA) sobre la estructura secundaria y la estabilidad térmica de KstR sugiere que podrían ser éstos los verdaderos inductores de la ruta, en lugar del colesterol o 4-colesten-3-ona como se había sugerido anteriormente. En particular, el compuesto 3OChA podría ser el mejor candidato como inductor debido a su particular efecto bimodal sobre la desnaturalización de la proteína. Dados los efectos observados con el ácido palmítico, éste no podía ser descartado de momento como posible inductor, a pesar de no ser un intermediario de la ruta de degradación del colesterol.

#### **2.4.2. Análisis de la interacción KstR-inductor mediante ultracentrifugación analítica**

La mayoría de los miembros de la familia de los reguladores TetR, como es el caso de KstR, suelen presentar una disposición homodimérica en solución (Huffman and Brennan, 2002; Ramos *et al.*, 2005). En un trabajo previo se describió que el regulador KstR de *M. tuberculosis* formaba dímeros tanto en solución como en asociación con el DNA (Kendall *et al.*, 2007). Para comprobar el estado oligomérico del represor KstR de *M. smegmatis* y determinar si éste sufre algún cambio en presencia de los supuestos inductores descritos en el apartado anterior (ácidos palmítico, 3OHChA y 3OChA) se analizó la oligomerización de la proteína KstR mediante experimentos de

## Resultados

velocidad de sedimentación utilizando la ultracentrifugación analítica tal y como se detalla en el apartado 11 de Materiales y Métodos. El perfil de distribución de coeficientes de sedimentación de KstR muestra la existencia de una especie mayoritaria (83%) con un coeficiente de sedimentación de 3 S, cuya masa molecular estimada  $\approx$  50 kDa se corresponde con un dímero de la proteína KstR. Se observó además una especie minoritaria (14%) con un coeficiente de sedimentación de 5 S, consistente con un tetrómero de KstR (Fig. 45A). Cuando se llevaron a cabo estos experimentos en la presencia de los ácidos palmítico, 3OHChA y 3OChA (250  $\mu$ M), la abundancia relativa de cada especie no varió sustancialmente, lo que sugiere que la interacción con los diferentes ligandos no produce ningún cambio importante en el estado oligomérico de KstR (Fig. 45 B, C y D).



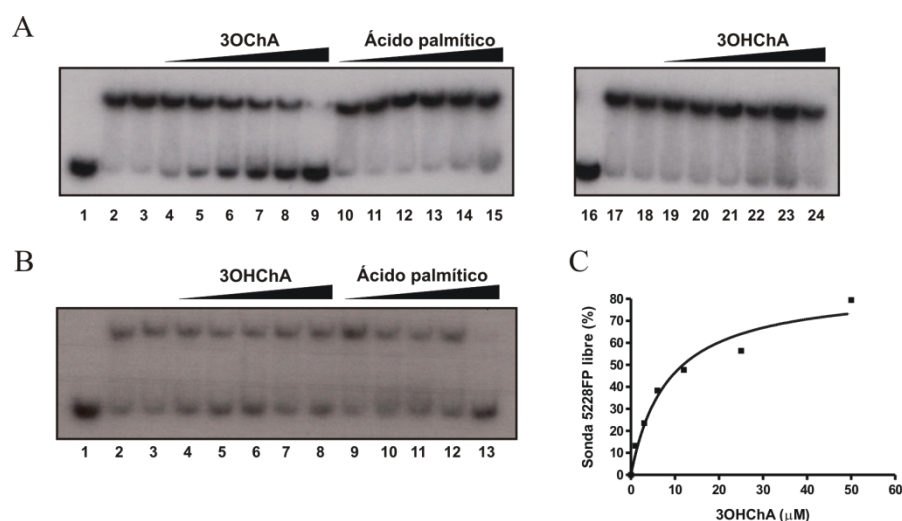
**Figura 45. Estudio del estado oligomérico de KstR en ausencia y presencia de ligando.** Análisis mediante velocidad de sedimentación de la proteína KstR en ausencia de ligando **(A)** y en presencia de 250  $\mu\text{M}$  de ácido palmítico **(B)**, 3OHChA **(C)** y 3OChA **(D)**. Se representa el perfil de distribución de concentraciones (eje de ordenadas) frente al coeficiente de sedimentación (eje de abscisas).

#### **2.4.3. Análisis *in vitro* del efecto de los inductores sobre la interacción KstR-DNA**

Una vez identificados el ácido palmítico, y los derivados 3OHChA y 3OChA como posibles inductores del represor KstR, se procedió a estudiar el efecto que podrían tener estos ácidos en la formación de los complejos DNA-KstR. Para ello, se realizaron experimentos de retardo en gel con la proteína KstR y las sondas 5228FP y PQ3 en presencia de estos compuestos.

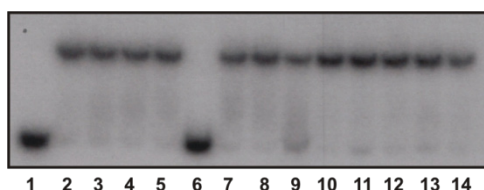
En el caso de la sonda 5228FP se observó que en presencia de 0.5  $\mu\text{M}$  de KstR sólo el compuesto 3OChA provocaba la liberación de la proteína del complejo DNA-KstR a bajas concentraciones (1-50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 46A, calles 4-9), encontrándose prácticamente la totalidad de la sonda libre a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de compuesto. Sin embargo, no se observó ninguna disminución significativa de afinidad de KstR por la sonda en presencia de las mismas concentraciones de los ácidos palmítico y 3OHChA (Fig. 46A, calles 10-15 y fig. 46B, 19-24 respectivamente). Es importante señalar que, en ciertas condiciones experimentales, utilizando KstR a una concentración más baja (0.25  $\mu\text{M}$ ), se pudo observar liberación de la sonda en presencia de una alta concentración de ácido palmítico (1 mM) (Fig. 46B). La  $K_d$  del 3OChA, definida como la concentración de compuesto a la cual la mitad de la sonda no se encuentra unida a KstR, se estimó mediante densitometrado y cuantificación de las bandas de retardo, obteniéndose un valor  $8.5 \pm 2.2 \mu\text{M}$  (Fig. 46C).

## Resultados



**Figura 46. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor  $P_{5228}$  en presencia de 3OChA, 3OHChA y ácido palmítico. (A)** Ensayo de retardo en gel con la proteína KstR (0 nM, calles 1 y 16; 0.5  $\mu$ M, resto de las calles) y la sonda 5228FP (0.5 nM) en presencia de concentraciones crecientes de 3OChA (calles 4-9), ácido palmítico (calles 10-15) y 3OHChA (calles 19-24). Las concentraciones de inductores probadas fueron 1, 3, 6, 12, 25 y 50  $\mu$ M. Se realizaron también reacciones de retardo con la proteína y la sonda 5228FP en presencia de 5% de metanol para chequear el efecto de éste en la formación de los complejos (calles 3 y 18). **(B)** Ensayo de retardo en gel de la sonda 5228FP en presencia de 0.25  $\mu$ M de KstR y con concentraciones superiores de 3OHChA (calles 4-8) y ácido palmítico (calles 9-13): 50, 100, 250, 500  $\mu$ M y 1 mM. **(C)** Representación gráfica de los porcentajes de sonda liberada en cada concentración de ligando. El ajuste de los datos a la ecuación de una hipérbola permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para el 3OChA.

Además de los ácidos palmítico, 3OHChA y 3OChA, la mayoría de los compuestos ensayados en los experimentos de CD que no ejercían ningún efecto sobre la estabilidad térmica de KstR (Tablas 8 y 9) fueron también probados mediante ensayos de retardo en gel. Como se muestra en la figura 47, a concentraciones de 250  $\mu$ M ninguno de ellos fue capaz de liberar la sonda 5228FP del complejo DNA-KstR.

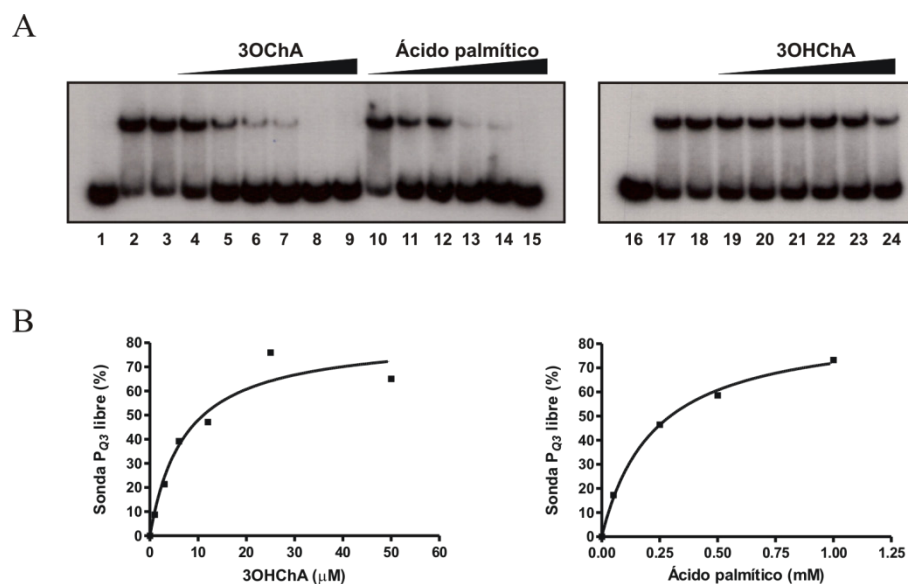


**Figura 47. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor  $P_{5228}$  en presencia de algunos de los compuestos probados mediante CD.** Ensayo de retardo en gel de la sonda 5228FP en presencia de 0.5  $\mu\text{M}$  de KstR y 250  $\mu\text{M}$  de los siguientes compuestos: 4-colesten-3-one (calle 4), colesterol (calle 5), 3OChA (calle 6), 3OHChA (calle 7), ADD (calle 8), ácido palmítico (calle 9), palmitoil alcohol (calle 10), ácido oleico (calle 11), oleil alcohol (calle 12), 1-octanol (calle 13) y ácido octanoico (calle 14).

También se estudió mediante ensayos de retardo en gel el efecto que ejercen el ácido palmítico, 3OHChA y 3OChA utilizando la sonda PQ3, que porta el promotor quimérico  $P_{Q3}$ . Como puede apreciarse en la figura 48A, y al igual que ocurría en el caso del promotor  $P_{5228}$ , el complejo PQ3-KstR se disocia en presencia de bajas concentraciones de 3OChA (1-50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 48A, calles 4-9) obteniéndose en este caso la total liberación de la sonda a 25  $\mu\text{M}$  de compuesto. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con la sonda 5228FP, el efecto del ácido palmítico es más drástico cuando se utilizó la sonda PQ3, obteniéndose una liberación del complejo PQ3-KstR- desde concentraciones de 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 48A, calles 10-15). Por su parte, el ácido 3OHChA no produjo ningún efecto sobre la interacción PQ3-KstR- (calles 19-24). Las constantes de afinidad aparentes ( $K_d$ ) para los ácidos 3OChA y palmítico, estimadas mediante densitometrado y cuantificación de las bandas de retardo, fueron de  $7.3 \pm 2.4 \mu\text{M}$  y  $226 \pm 26 \mu\text{M}$  respectivamente (Fig. 48B).



## Resultados



**Figura 48. Estudio de la interacción de la proteína KstR con el promotor  $P_{Q3}$  en presencia de 3OChA, 3OHChA y ácido palmítico. (A)** Ensayo de retardo en gel de proteína KstR (0 nM, calles 1 y 16; 0.5  $\mu$ M, resto de las calles) con la sonda  $P_{Q3}$  (0.5 nM) en presencia de concentraciones crecientes de 3OChA (calles 4-9), ácido palmítico (calles 10-15) y 3OHChA (calles 19-24). Las concentraciones de 3OChA probadas fueron 1, 3, 6, 12, 25 y 50  $\mu$ M, y de ácido palmítico y 3OHChA 10, 50, 100, 250, 500  $\mu$ M y 1 mM. Las reacciones de las calles 3 y 18 se realizaron en presencia de 5% de metanol. **(B)** Representación gráfica de los porcentajes de sonda liberada en cada concentración de 3OChA (izquierda) y ácido palmítico (derecha). El ajuste de los datos a la ecuación de una hipérbola permitió la estimación de la constante de disociación aparente ( $K_d$ ) para cada uno de los compuestos.

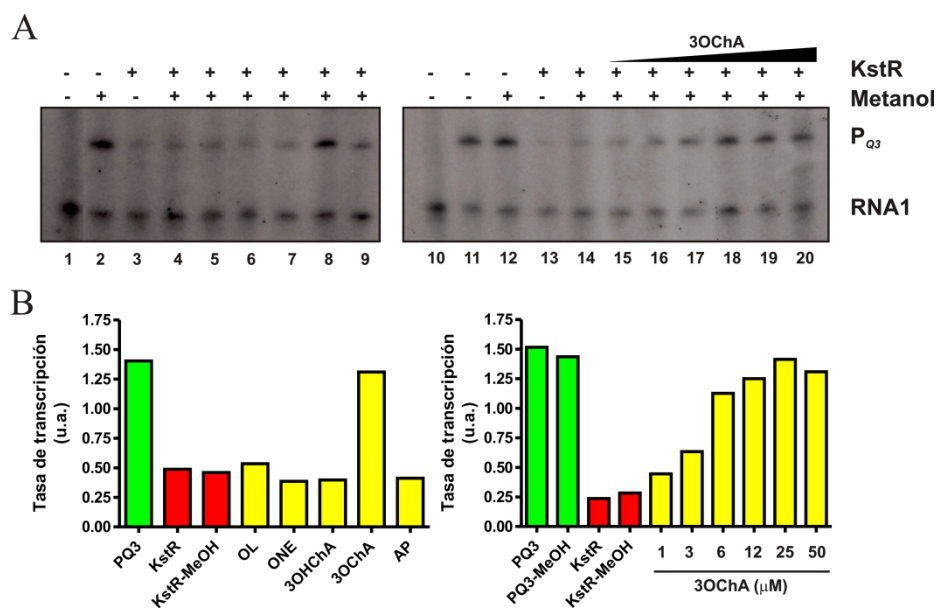
### 2.4.4. Análisis *in vitro* del efecto de los inductores sobre la transcripción mediada por el promotor $P_{Q3}$

Como se comentó en el apartado 2.2.2. de Resultados, la imposibilidad de emplear promotores nativos de *M. smegmatis* en experimentos de transcripción *in vitro* con la RNAP de *E. coli*, condujo al diseño del promotor artificial  $P_{Q3}$  que contiene las cajas -35 y -10 del promotor  $P_{lacUV5}$  de *E. coli* y, localizada entre ellas, la caja operadora

de KstR. Este promotor es reconocido por la RNAP de *E.coli* (Fig. 38), y es activo *in vitro* dando lugar a la síntesis de un transcrito de 152 nt (Fig. 39). En presencia de KstR la transcripción mediada por  $P_{Q3}$  se inhibe, confirmándose así su funcionalidad como represor transcripcional.

Para estudiar el efecto que tienen sobre la transcripción los compuestos propuestos como posibles inductores mediante CD y ensayos de retardo en gel, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* (*multiple round*) utilizando como molde el plásmido control pJCD01y el plásmido JCDPQ3 que porta el promotor  $P_{Q3}$ . En ausencia de KstR, se produjo la síntesis del transcrito control RNA1 (107-108 nt) y del transcrito debido a la acción del promotor  $P_{Q3}$  (152 nt) (Fig. 49A, calles 1-2 y 10-12). Cuando se añadió el represor KstR a una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$ , la transcripción se inhibió claramente (Fig. 49A, calles 3-4 y 13-14). La adición de concentraciones crecientes de 3OChA (1-50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 49A, calles 15-20; Fig. 49B, panel derecho) restauró el nivel de transcripción a partir del promotor  $P_{Q3}$ . Sin embargo, ninguno de los otros compuestos probados, colesterol, 4-colesten-3-ona, 3OHChA y ácido palmítico (Fig 49A, calles 5, 6, 7 y 9 respectivamente), fueron capaces de contrarrestar el efecto represor de KstR, incluso a altas concentraciones (250  $\mu\text{M}$ ). Estos resultados demuestran por primera vez el efecto de 3OChA en la activación de la transcripción a partir de un promotor regulado por KstR, siendo capaz este compuesto de evitar la represión ejercida por KstR en unas condiciones experimentales que mimetizan la transcripción *in vivo*.

## Resultados



**Figura R49. Inducción de la transcripción a partir del promotor *PQ3* en condiciones de represión en presencia de KstR. (A)** Experimentos de transcripción *in vitro* a partir de los plásmidos pJCD01 (calles 1 y 10) y pJCDPQ3 (resto de calles), empleados a una concentración de 1 nM. Los símbolos + y - indican la adición o no de KstR (0.5  $\mu$ M) y metanol (4%). En las calles 5-9 se muestran las reacciones realizadas en presencia de 250  $\mu$ M de cada uno de los ligando probados: colesterol (calle 5), 4-colesten-3-ona (calle 6), 3OHChA (calle 7), 3OChA (calle 8) y ácido palmítico (calle 9). En las calles 15-20 se muestran las reacciones realizadas en presencia de concentraciones crecientes de 3OChA: 1, 3, 6, 12, 25 y 50  $\mu$ M. **(B)** Representación gráfica de la tasa de transcripción del promotor *PQ3*. Los resultados que se representan corresponden a la intensidad de los transcritos debidos al promotor *PQ3* en relación a la intensidad del transcrito control (*PQ3*/RNA1).

## **VI.DISCUSIÓN**



## **1. Análisis de los citocromos P450 implicados en la degradación de la cadena lateral del colesterol en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155**

---

El estudio de la degradación del colesterol y otros esteroides por parte de la bacteria *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 fue objeto de estudio en una Tesis Doctoral previa en el laboratorio. Como resultado de este trabajo, se identificaron los genes implicados en el transporte, regulación y metabolismo de estas moléculas. Además, se caracterizaron desde el punto de vista bioquímico dos de las proteínas responsables de la transformación de colesterol en colesteno, generalmente aceptado como el primer paso de la ruta catabólica (Uhía, 2010).

Aunque la descripción de la ruta de degradación de colesterol ha sido propuesta mediante la combinación de diversos estudios genéticos y bioquímicos en diferentes microorganismos, dicha ruta no ha sido completamente descrita en ninguna de las bacterias degradadoras de esteroides conocidas hasta el momento (Sobel and Plaut, 1974; Brzostek *et al.*, 2005; Andor *et al.*, 2006; Uhía *et al.*, 2011; Klepp *et al.*, 2012; Brzostek *et al.*, 2013). Por este motivo, uno de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral fue el de avanzar en la caracterización de algunas de las enzimas de la ruta catabólica del colesterol en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, concretamente en la caracterización de los citocromos P450 CYP125A3 y CYP142A2.

Para realizar esta caracterización los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 fueron sobreproducidos en *E. coli* y purificados mediante cromatografía de afinidad seguida de dos pasos de cromatografía de intercambio iónico (Fig. 7 y 17). El análisis espectroscópico en el UV-visible de las dos proteínas recombinantes producidas heterológicamente confirmó que se trata de citocromos P450 que se encuentran mayoritariamente en su estado funcional, aunque una pequeña proporción de ellas fue purificada en su forma inactiva P420 (Fig. 8). El citocromo CYP125A3 se encuentra, en su mayoría, en un estado de alto espín, algo atípico para los citocromos P450, los cuales, en su estado estacionario, suelen presentar el hierro del grupo hemo en un estado de bajo espín debido a la interacción con una molécula de agua que ocupa la sexta posición

de coordinación (Williams-Smith and Cammack, 1977). Sin embargo, esto había sido descrito previamente para los citocromos CYP125 de *M. tuberculosis* y *R. jostii* (Capyk *et al.*, 2009; Ouellet *et al.*, 2009; Rosłonec *et al.*, 2009; Ouellet *et al.*, 2010), por lo que puede decirse que se trata de una característica especial de este tipo de citocromos. Por su parte, el CYP142A2 sí que se encuentra en su totalidad en estado de bajo espín (Fig. 18), tal y como se había observado en el CYP142A1 de *M. tuberculosis* (Driscoll *et al.*, 2010; Johnston *et al.*, 2010).

Mediante ensayos de unión a ligandos se ha demostrado que ambos citocromos se unen a colesterol y a colesteno (Fig. 10 y 20), lo que provoca una transición del pico de Soret a 393 nm (transición de tipo I) debido al desplazamiento de la molécula de agua que ocupa la sexta posición de coordinación del átomo de hierro del grupo hemo. Esta transición es mucho más evidente en el caso del citocromo CYP142A2, ya que en el citocromo CYP125A3, la mayor parte de la proteína en su forma libre ya se encuentra en un estado de alto espín. Estas diferencias en el estado estacionario de los dos citocromos podría ser la razón de las diferentes afinidades observadas para cada uno de ellos por los sustratos. A juzgar por los valores de  $K_d$  obtenidos (Tabla 11), ambas proteínas parecen unirse con mayor afinidad al colesterol que a la colesteno, y si se comparan las dos proteínas entre sí, la menor  $K_d$  observada para la proteína CYP142A2 indicaría que ésta presenta una mayor afinidad por los sustratos que el citocromo CYP125A3.

Los ensayos de actividad monooxigenasa realizados con las dos enzimas pusieron de manifiesto, que al igual que ocurre con los citocromos homólogos de *M. tuberculosis* (Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011) los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis* catalizan la oxidación secuencial del C26 de la cadena lateral del colesterol o la colesteno generando los derivados alcohol, aldehído y ácido correspondientes. Sin embargo, parece que el CYP125A3 realiza preferentemente la primera reacción de oxidación que lleva a la formación del derivado alcohol (26-hidroxi-4-colesteno-3-ona), ya que sólo fue posible detectar pequeñas trazas del derivado ácido (ácido 4-colesteno-3-ona-26-oico) cuando se

analizaron los productos generados en los ensayos enzimáticos. El análisis de la producción de 26-hidroxi-4-colesten-3-ona permitió el cálculo de los parámetros cinéticos de cada enzima. De estos resultados se deriva que, aunque ambas enzimas presentan una  $K_m$  muy similar (14.0  $\mu\text{M}$  y 10.3  $\mu\text{M}$  para el CYP125A3 y el CYP142A2, respectivamente), los valores de  $K_{cat}$  obtenidos para cada uno de ellos (1.8  $\text{min}^{-1}$  y 4.2  $\text{min}^{-1}$ ) muestran que CYP142A2 es catalíticamente más activo que CYP125A3. Estos datos están en concordancia con la mayor afinidad del CYP142A2 observada en los ensayos de unión a colesterol y colesteno.

La mayor afinidad por los sustratos del citocromo CYP142 frente al CYP125 en *M. smegmatis* también había sido observada previamente en sus ortólogos en *M. tuberculosis*, tal y como se deduce de los valores de  $K_d$  estimados para estas enzimas (Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2010) y que se muestran en la Tabla 11. Sin embargo, a diferencia de lo descrito aquí para *M. smegmatis*, el citocromo que presenta una mayor actividad catalítica en *M. tuberculosis* es el CYP125 (Johnston *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011). Tal y como revelaron los ensayos de crecimiento y producción de intermediarios en las diferentes cepas mutantes de *M. smegmatis* que carecen de estas enzimas, parece que el citocromo CYP125A3 tiene una mayor implicación fisiológica que el CYP142A2 en el metabolismo de la cadena lateral del colesterol, lo que contrasta con el hecho de que en los ensayos enzimáticos realizados *in vitro* haya sido el CYP142A2 el que presenta una mayor actividad catalítica. Estas diferencias en la actividad enzimática entre una proteína y otra podrían simplemente deberse a una menor estabilidad de la proteína CYP125A3 purificada. Esta hipótesis estaría respaldada por el hecho de que una mayor proporción del CYP125A3 fue purificada en su forma inactiva (P420) en comparación con el CYP142A2.

Los compuestos azólicos han sido ampliamente desarrollados por la industria farmacéutica por su interés como inhibidores de del citocromo CYP51 implicado en la biosíntesis de esteroides en ciertos microorganismos patógenos (Warrilow *et al.*, 2013). Este tipo de compuestos han demostrado tener un potente efecto inhibitor del crecimiento en *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y diversas cepas del género *Streptomyces*



## Discusión

(McLean *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2006b), así como un efecto supresor de la infección por *M. tuberculosis* en modelos animales (Ahmad *et al.*, 2006a; Byrne *et al.*, 2007). Por este motivo la unión de estos inhibidores a citocromos P450 de *M. tuberculosis* se estudia de manera rutinaria durante los procesos de caracterización de los mismos.

Los compuestos miconazol, econazol y clotrimazol actúan como inhibidores de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis*, al igual había sido descrito para sus ortólogos en *M. tuberculosis* (McLean *et al.*, 2009; Driscoll *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011). Los valores de las constantes de disociación de los citocromos para estos azoles han sido recopilados en la Tabla 11. Como puede observarse, en ambas cepas los dos citocromos se unen con una mayor afinidad al compuesto miconazol. Esto contrasta con lo descrito por otros autores sobre el efecto de estos compuestos en el crecimiento de estas cepas, en las que el econazol es el que presenta un mayor efecto inhibidor (McLean *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2006b). El citocromo CYP121 caracterizado en *M. tuberculosis* es esencial para la viabilidad de la bacteria. De todos los compuestos azólicos probados, el econazol es que presenta una mayor afinidad de unión al CYP121, lo que explica el drástico efecto de este inhibidor en el crecimiento de la bacteria (McLean *et al.*, 2008).

Ligando	K <sub>d</sub> (μM)			
	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 CYP125A3	CYP142A2	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CYP125A1	CYP142A1
<b>Sustrato</b>				
Cholesterol	1.10±0.50	0.14±0.07	0.11±0.06 <sup>a</sup>	0.018±0.005 <sup>b</sup>
4-cholesten-3-one	2.30±1.40	0.52±0.26	1.18±0.11 <sup>a</sup>	0.114±0.017 <sup>b</sup>
<b>Inhibidor</b>				
Miconazole	1.66±0.21	6.58±0.70	4.6±0.4 <sup>c</sup>	4.0±0.5 <sup>d</sup>
Econazole	7.38±0.71	7.40±0.52	11.7±0.7 <sup>c</sup>	4.6±0.2 <sup>d</sup>
Clotrimazole	14.53±1.58	16.20±0.75	5.3±0.6 <sup>c</sup>	3.8±0.9 <sup>d</sup>

**Tabla 11. Constantes de disociación aparentes de los citocromos CYP125 y CYP142 de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* de los sustratos e inhibidores probados.** Los valores correspondientes a las proteínas de *M. smegmatis* son los que se han obtenido experimentalmente en este trabajo (apartado 1.3.3.1. de Resultados). Los valores correspondientes a *M. tuberculosis* se han tomado de Ouellet *et al.*, 2010 (a), Johnston *et al.*, 2010 (b), McLean *et al.*, 2009 (c) y Driscoll *et al.*, 2010 (d).

El análisis del crecimiento en colesterol y colesteno de la cepa silvestre de *M. smegmatis* y de los diferentes mutantes en los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 permitió el estudio del papel fisiológico de estas proteínas en el metabolismo de estos esteroides en esta cepa.

Exceptuando al doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$ , el crecimiento de *M. smegmatis* en colesteno es más rápido que en colesterol. Una de las razones que pueden explicar estas diferencias es el hecho de que el colesterol necesita ser transformado a colesteno mediante las enzimas 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas (3- $\beta$ -HSD) para poder continuar su degradación. La necesidad de este primer paso oxidativo en el C3 puede estar ralentizando el proceso catabólico, ya que la velocidad de las siguientes reacciones estaría condicionada a la velocidad de producción de colesteno. Otra de las razones por las cuales el crecimiento en colesteno es más rápido, podría estar relacionada con el transporte de la misma. Por lo que se conoce hasta el momento, el transporte de colesterol al interior celular se produce a través del sistema de transporte *mce4* (Mohn *et al.*, 2008; Pandey and Sassetti, 2008), siendo posible que la colesteno pudiera ser transportada de la misma manera. Si esto fuera así, una mayor eficacia del transportador por unirse a la colesteno supondría una más rápida disponibilidad de ésta en el citoplasma y explicaría el crecimiento más rápido de la bacteria en este sustrato. Finalmente, la mayor solubilidad de la colesteno frente al colesterol podría suponer una ventaja tanto para su transporte al estar en mayor concentración en el agua del medio de cultivo y ser más biodisponible, como para la difusión de ésta por el citoplasma, haciéndola más accesible a las proteínas que la transforman.

Los resultados obtenidos en los estudios de crecimiento llevados a cabo con los diferentes mutantes  $\Delta\text{Cyp125}$ ,  $\Delta\text{Cyp142}$  y  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  parecen indicar que, al igual que se ha descrito para *M. tuberculosis* (Johnston *et al.*, 2010), el CYP125A3 es el principal citocromo implicado en los primeros pasos de oxidación de la cadena lateral del colesterol y la colesteno, ya que la mutación del CYP142A2 no produce ningún efecto negativo en el crecimiento de la bacteria, y sin embargo, la mutación del

## Discusión

CYP125A3 causa un ligero retraso en el crecimiento en estas fuentes de carbono, principalmente en colestenona. Dicho retraso en el crecimiento se correlaciona con el hecho de que los metabolitos intermediarios 26-hidroxi-4-colestén-3-ona y ácido 4-colestén-3-ona-26-oico se acumulan más tarde y en menor cantidad en este mutante. Mediante experimentos de qRT-PCR se observó que en este mutante  $\Delta$ Cyp125 la expresión del gen codificante del citocromo CYP142A2 se induce unas 13 veces con respecto a su expresión en la cepa silvestre. Dicha inducción se traduce en un incremento de la expresión de la proteína, la cual fue detectada mediante *Western blot*. Por tanto, puede decirse que en este mutante  $\Delta$ Cyp125 el citocromo CYP142A2 es el responsable de la producción de los derivados alcohol y ácido en el C26 de la cadena lateral de la colestenona, permitiendo así el crecimiento de la bacteria. El hecho de que los intermediarios se acumulen en menor proporción podría ser reflejo de una menor actividad *in vivo* de la proteína CYP142A2 con respecto al CYP125A3.

Aunque la mutación del CYP142A2 no produce ningún efecto en el crecimiento de la bacteria, sí se observan algunas diferencias en la acumulación de metabolitos intermediarios. A pesar de que la producción de 26-hidroxi-4-colestén-3-ona no varía con respecto a la cepa silvestre, sí se observó una disminución en la acumulación del ácido 4-colestén-3-ona-26-oico. El desequilibrio en la acumulación de los dos compuestos en este mutante podría sugerir una mayor preferencia del CYP125A3 por la primera reacción de oxidación del C26 que conlleva la formación del derivado alcohol. Esta hipótesis concuerda con los resultados de los ensayos enzimáticos con CYP125A3, en los que sólo fue posible detectar trazas del derivado ácido. Partiendo de esta premisa, y puesto que en la cepa silvestre no se dan estas desigualdades en la producción de los dos intermediarios, podría decirse que el citocromo CYP125A3 es el que mayor implicación tiene en el primer paso de oxidación del C26 y el CYP142A2 podría estar contribuyendo en mayor medida en las dos siguientes reacciones de oxidación que llevan a la producción de los derivados aldehído y ácido.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, puede decirse que los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 son los principales responsables de los primeros

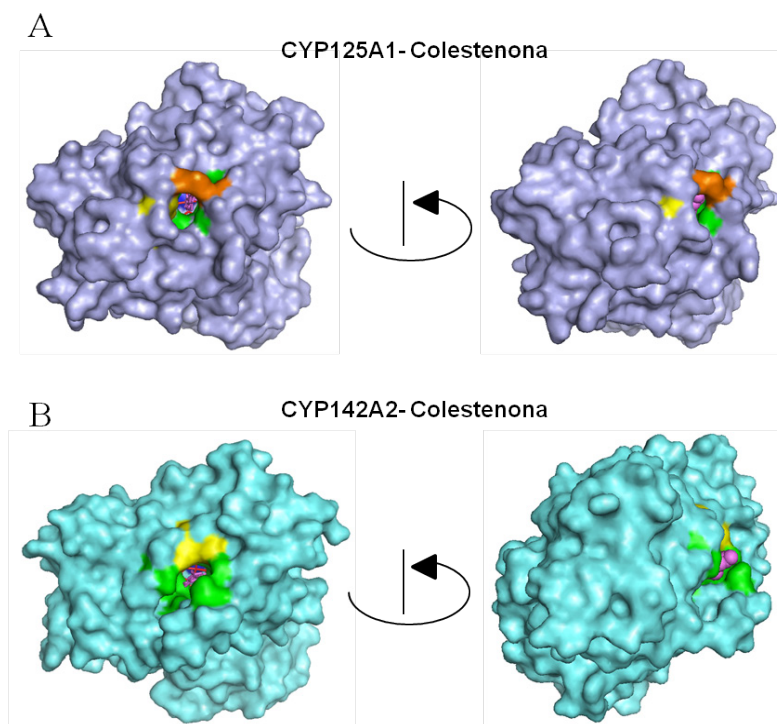
pasos en la degradación de la cadena lateral del colesterol en *M. smegmatis*, ya que el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  presenta un importante retraso en el crecimiento, principalmente en los cultivos con colesteno, y además apenas se produce acumulación de los derivados alcohol y ácido en el medio de cultivo. Aunque se observa una ligera producción de estos dos intermediarios, ésta es muy inferior a los niveles alcanzados en la cepa silvestre o incluso en los mutantes simples  $\Delta\text{Cyp125}$  y  $\Delta\text{Cyp142}$ . Probablemente esta pequeña producción se deba a la actividad de algún otro citocromo P450 codificado en el genoma de *M. smegmatis* que puede realizar las reacciones de oxidación llevadas a cabo por CYP125A3 y CYP142A2. En los experimentos de *microarrays* realizados con anterioridad en el laboratorio se observó que el gen *MSMEG\_4829* presenta una inducción en colesterol de 10.7 veces con respecto al glicerol, aunque dicho citocromo no parece estar regulado por ninguno de los reguladores de la ruta del colesterol conocidos hasta el momento (KstR y KstR2). Estos datos sugirieron que este citocromo podría ser un buen candidato para reemplazar a los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 en el doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$ . Los experimentos de qRT-PCR en los que se analizó la expresión del gen *MSMEG\_4829* en la cepa silvestre y en los mutantes  $\Delta\text{Cyp125}$  y  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  revelaron que dicho gen se encuentra ligeramente inducido en colesterol frente a glicerol, pero los niveles de RNA son muy bajos en comparación con los niveles observados para el citocromo CYP142A2. El citocromo codificado por el gen *MSMEG\_4829* ha sido recientemente estudiado en el laboratorio del profesor P. Ortiz de Montellano, y tanto los ensayos de afinidad como los ensayos enzimáticos llevados a cabo indican que este citocromo no interacciona con colesterol ni con colesteno, ni tampoco es capaz de realizar las reacciones de oxidación en el C26 de la cadena lateral de estos esteroides (comunicación personal de Daniel J. Frank). Por tanto, a la vista de estos resultados, no parece que el citocromo codificado por el gen *MSMEG\_4829* tenga una implicación directa en la degradación de la cadena lateral del colesterol, aunque no puede descartarse su actuación en algún otro paso de la ruta de degradación de este esteroide.

## 2. Evolución estructural de los citocromos P450 CYP125 y CYP142 en micobacterias

---

Como se ha comentado, la estructura del citocromo CYP125A3 unida a alguno de sus sustratos, colesterol o colesteno, no ha podido ser determinada, sin embargo, la posición de éstos se puede deducir a partir de la estructura de su ortólogo en *M. tuberculosis* unido a colesteno, ya que las diferencias en los residuos del centro activo entre uno y otro son insignificantes. Basándose en esta aproximación, podría decirse que el centro activo del citocromo CYP125A3 estaría completamente encerrado quedando el sustrato totalmente confinado en el interior de la proteína. Sin embargo, tal y como se ha podido observar en la estructura del CYP142A2, la entrada al centro activo presenta una conformación más abierta, haciendo que éste no se localice tan profundo y causando que el grupo carbonilo de la colesteno quede expuesto al solvente (Fig. 50). Esta conformación más abierta del centro activo del CYP142A2 podría permitir la entrada de otros esteroides más largos con modificaciones en el C3, tales como ésteres de colesterol o colesterol sulfato, que probablemente no tengan cabida en el centro activo del citocromo CYP125A3, cuya estructura parece mucho más compacta. Sobre la base a esta diferencia en la topología de los sitios activos de las dos proteínas, podría especularse que la función fisiológica del citocromo CYP142 podría estar dirigida a otros derivados de esteroides que por su estructura fueran inaccesibles al CYP125. Concretamente, los ésteres de colesterol de ácidos grasos, que son muy abundantes en macrófagos humanos infectados por micobacterias (Kondo y Murohashi, 1971; Kondo y Kanai, 1974; 1976; Kupur y Mahadevan, 1982), podrían ser sustratos potenciales para el CYP142A2 de *M. tuberculosis*. Esta observación sobre la diferente especificidad en la unión de los sustratos en función de la topología del centro activo de los citocromos P450 ya ha sido descrita con anterioridad. Por ejemplo, el centro activo del citocromo CYP121 de *M. tuberculosis* se localiza en una cavidad larga altamente comprimida en las proximidades del grupo hemo, lo que se ha relacionado con una elevada especificidad de sustrato (Leys *et al.*, 2003). Sin embargo, el citocromo CYP51B1 de *M. tuberculosis*, es una esterol demetilasa que puede actuar sobre una gran

variedad de sustratos (incluso esteroides derivados de plantas) (Bellamine *et al.*, 1999) y cuya estructura se caracteriza por presentar una hélice I más desordenada y la región BC más extendida, creando un acceso más amplio al centro activo (Podust *et al.*, 2004).

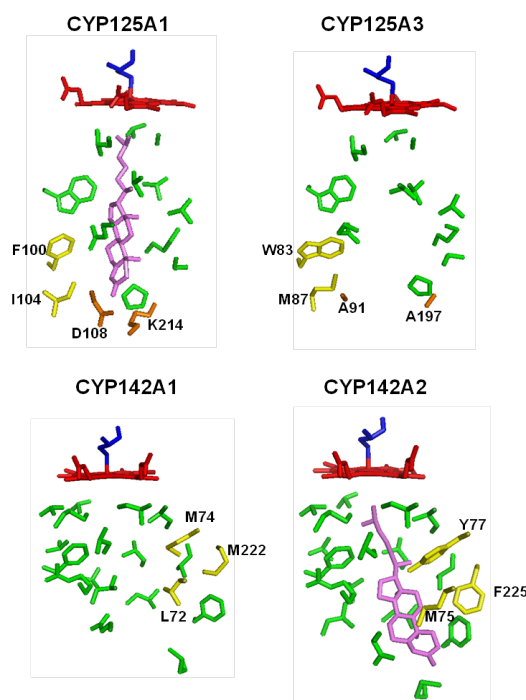


**Figura 50. Comparación de la posición de la colesthenona en las proteínas CYP125A1 de *M. tuberculosis* (A) y CYP142A2 de *M. smegmatis* (B).** En verde se indican las zonas donde se encuentran los residuos de unión a colesthenona y en amarillo los residuos no conservados entre *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. En naranja se muestran los residuos D108-K214 que constituyen el puente salino que protege la entrada al centro activo. Al fondo del centro activo puede distinguirse parte del grupo hemo (color rojo) y la cisteína conservada que se une a él (color azul oscuro). La colesthenona se representa en color violeta.

En comparación con los ortólogos de *M. tuberculosis*, tanto CYP125A3 como CYP142A2 de *M. smegmatis* presentan algunas sustituciones de aminoácidos en las proximidades al centro activo. Dichas sustituciones consisten en residuos más

## Discusión

voluminosos, principalmente en el caso del citocromo CYP142A2 (Fig. 51). El mayor tamaño de las cadenas laterales de estos residuos en esta proteína podría ser el causante de la pequeña torsión observada en la molécula de colesteno y quizás explicar su menor afinidad por el colesterol y la colesteno en comparación con el CYP142A1 de *M. tuberculosis*. La falta de conservación en estos residuos podría indicar que las enzimas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* han evolucionado para transformar esteroides con diferentes sustituyentes en el sistema de anillos policíclicos. En este sentido, el colesterol, el principal esteroide en los vertebrados, tiene una estructura relativamente plana y lineal, mientras que el ergosterol, principal componente de las membranas celulares en los eucariotas inferiores, tales como hongos y protozoos, posee un doble enlace adicional que produce una cierta curvatura en el sistema de anillos. Estas diferencias sutiles en la estructura química de diferentes esteroides podrían haber impulsado la diversificación de los sitios activos de los citocromos CYP125 y CYP142 en micobacterias patógenas y ambientales. *M. tuberculosis*, que infecta células humanas no tendría acceso a otros esteroides naturales diferentes del colesterol o la colesteno, mientras que *M. smegmatis*, de vida libre en el medio ambiente, podría emplear los fitosteroides del suelo y otros ésteres de esteroides como sustratos. Por esta razón los citocromos de *M. smegmatis* podrían ser más flexibles y aceptar una mayor variedad de sustratos que sus ortólogos en *M. tuberculosis*.



**Figura 51.** Comparación de los residuos del centro activo de las proteínas CYP125A3 y CYP142A2 de *M. smegmatis* y sus ortólogos CYP125A1 y CYP142A1 de *M. tuberculosis*. En rojo se representa el grupo hemo, en azul la cisteína conservada, en verde los residuos conservados entre las dos especies y en amarillo y naranja los residuos no conservados. Sólo se indican los residuos no conservados.

### 3. Análisis de la regulación transcripcional mediada por el regulador KstR

El catabolismo bacteriano del colesterol y otros compuestos esteroideos ha adquirido una gran relevancia en los últimos años, no sólo debido a la importancia de estas sustancias como contaminantes ambientales (Veiga *et al.*, 2005; Gagné *et al.*, 2006), sino debido principalmente al descubrimiento del papel fundamental que desempeña el colesterol en los procesos de infección de *M. tuberculosis* (Schnappinger *et al.*, 2003; Rengarajan *et al.*, 2005; Pandey and Sassetti, 2008; Chang *et al.*, 2009;



Nesbitt *et al.*, 2010; Ouellet *et al.*, 2011; Griffin *et al.*, 2012). Al inicio de esta Tesis Doctoral se conocía que la expresión de los genes implicados en el catabolismo del colesterol en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* está controlada por los represores KstR y KstR2, ambos pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales TetR (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010; Nesbitt *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2011; Uhía *et al.*, 2012). Sin embargo, todos los experimentos llevados a cabo hasta la fecha no habían permitido determinar el inductor del KstR, papel inicialmente atribuido al colesterol o la colesteno, por ser los primeros metabolitos de la ruta de degradación (Kendall *et al.*, 2007; Kendall *et al.*, 2010; Uhía *et al.*, 2012). El efecto del colesterol y de la colesteno había sido probado mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en *E. coli* empleando la fusión traduccional entre el promotor  $P_{5228}$  de *M. smegmatis* y el gen *lacZ* ( $P_{5228} :: lacZ$ ) en presencia del represor KstR. La adición al medio de cultivo de colesterol o colesteno no inhibía la represión de la  $\beta$ -galactosidasa mediada por KstR (Uhía *et al.*, 2011a). Además en este mismo trabajo se demostró mediante ensayos de retardo en gel que la interacción entre el promotor  $P_{5228}$  y la proteína KstR no se veía afectada por la presencia de colesterol o colesteno. Aunque estos resultados parecían indicar que ninguno de estos compuestos eran los inductores del sistema, estos datos no eran concluyentes porque se realizaron o bien en un sistema heterólogo (*E. coli*) en el que podría existir un problema de transporte de estos esteroides al interior celular, o bien en unas condiciones *in vitro* muy diferentes a las condiciones naturales del sistema *in vivo*.

Otra de las estrategias empleadas para intentar demostrar la implicación de estos esteroides en la inducción de KstR consistió en la construcción de mutantes de *M. smegmatis* bloqueados en los primeros pasos de la ruta de degradación, concretamente mutantes en los genes *MSMEG\_5228* y *MSMEG\_5233*, que codifican la 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- $\beta$ -HSD) y la colesterol deshidrogenasa/isomerasa (SDR) respectivamente, implicadas en el paso de transformación del colesterol en colesteno (Uhía *et al.*, 2011b), y mutantes de delección de los genes *MSMEG\_5995* y *MSMEG\_5918*, que codifican los citocromos CYP125A3 y CYP142A2 respectivamente,

implicados en los primeros pasos de degradación de la cadena lateral del colesterol y que han sido caracterizados en esta Tesis Doctoral. Aunque la tasa de duplicación de estos mutantes cultivados en colesterol o colesteno como única fuente de carbono es más elevada que la de la cepa silvestre (principalmente los mutantes dobles), pero finalmente son capaces de crecer debido a la elevada redundancia de estas enzimas en el genoma de *M. smegmatis*. La imposibilidad de obtener un mutante bloqueado en los primeros pasos de la ruta de degradación ha hecho imposible hasta el momento la identificación del inductor mediante una aproximación genética.

Por todo lo comentado anteriormente, se optó por emplear otra serie de técnicas que permitieran estudiar la interacción del regulador KstR y sus posibles moléculas inductoras. En este sentido, el diroísmo circular (CD) es una técnica espectroscópica que permite analizar la estructura secundaria y terciaria de las proteínas en función de su espectro de absorción en el UV lejano y el UV cercano respectivamente. Además, el CD también permite el estudio de la estabilidad de las proteínas en presencia de agentes desnaturizantes o en función de la temperatura. Generalmente la unión de los ligandos a las proteínas produce un cambio conformacional en éstas, afectando a su estructura secundaria y terciaria, y modificando su perfil de desnaturización, que puede ser detectado mediante la alta sensibilidad a los cambios estructurales que proporciona el análisis de las proteínas por CD (Kelly *et al.*, 2005). Por todo ello se decidió emplear esta técnica como herramienta para estudiar la interacción del represor KstR con sus posibles moléculas inductoras.

Los estudios de desnaturización térmica monitorizados mediante CD realizados con ácido palmítico constituyen la primera evidencia experimental de que KstR es capaz de interaccionar de manera selectiva con ácidos grasos de cadena larga. El hecho de que el ácido oleico tuviera un efecto similar al ácido palmítico sobre la estabilidad térmica de la proteína KstR, y los ácidos de cadena más corta, así como los alcoholes derivados de todos ellos no ejercieran ningún efecto, puso de manifiesto los requerimientos de una cadena hidrofóbica larga y un grupo carboxilo para inducir cambios conformacionales en el regulador KstR. Esto proporcionó la primera evidencia

## Discusión

para explorar como posibles efectores otros compuestos carboxílicos producidos durante las primeras etapas de la degradación del colesterol, tales como 3OHChA, producto derivado de la reacción de los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, y 3OChA, generado tras la actuación secuencial de la 3- $\beta$ -HSD y dichos citocromos. La unión de estas moléculas provocó una reducción drástica de la estabilidad térmica de la proteína KstR (entre 20 y 30°C), lo que se relaciona con una gran desestabilización estructural de la misma. También fueron probados otros intermediarios de degradación del colesterol, tales como el 27-hidroxicolesterol, producido tras el primer paso de oxidación del colesterol llevado a cabo por los citocromos CYP125A3 y CYP142A2, y el AD y ADD, considerados como intermediarios centrales de las rutas de degradación de esteroides. La estabilidad térmica de KstR no se afectó por ninguno de estos compuestos sugiriendo que ninguno de ellos interaccionaba con el regulador.

La reducción de la estabilidad térmica de KstR producida por la unión del ácido palmítico y los derivados del colesterol 3OHChA y 3OChA puede atribuirse a una disminución del contenido en  $\alpha$ -hélice que se confirmó mediante la comparación de los espectros de CD en el UV lejano de la proteína KstR en ausencia y en presencia de estos compuestos. La proteína KstR presenta un contenido del 62% de  $\alpha$ -hélice estimado por CD, es decir, un contenido muy alto como es habitual en todos los reguladores de la familia TetR (Ramos *et al.*, 2005). El contenido de  $\alpha$ -hélice estimado a partir de la estructura cristalográfica de la proteína KstR de *M. tuberculosis* (PDB: 3MNL) es del 84%. Las diferencias entre las estimaciones del contenido en  $\alpha$ -hélice, *i.e.*, por CD y cristalográfica, son debidas al diferente estado en el que se encuentra cada proteína, soluble y probablemente más flexible en el caso del KstR de *M. smegmatis*, y rígido formando una estructura cristalina en el caso de *M. tuberculosis*. En este sentido hay que señalar que existe un elevado número de aminoácidos que aparecen en el cristal de KstR formado parte de pequeñas  $\alpha$ -hélices que muy probablemente no den las señales características de  $\alpha$ -hélice en CD cuando la proteína está en solución. Además hay que tener en cuenta que en las estimaciones del contenido de estructura secundaria realizadas a partir de las medidas de CD en el UV lejano se cometen pequeños errores

que derivan de asumir valores promedio de dicroísmo para todas las estructuras secundarias de un mismo tipo y que no necesariamente tienen que ser idénticos para todas las proteínas, ya que las estructuras se encuentran en entornos diferentes en cada caso.

Lo que se observa de manera muy evidente por las medidas de CD es que el contenido de  $\alpha$ -hélice del KstR de *M. smegmatis* se reduce en presencia de ácido palmítico, 3OHChA y 3OChA, observándose un efecto más claro (18 % de pérdida de  $\alpha$ -hélice) en el caso del 3OChA, lo que indica que este compuesto ocasiona una desestabilización más drástica que el ácido palmítico y el 3OHChA. Los cambios conformacionales en la estructura secundaria causada por la unión de un efector se han descrito para otros reguladores, ya sean represores o activadores. Sin embargo, es importante destacar que, en todos los casos anteriormente descritos los efectores causaron un ligero aumento en la estabilidad de la proteína (Tahlan *et al.*, 2008; Manso *et al.*, 2009; Carette *et al.*, 2012), en contraste con la enorme disminución en la estabilidad observada en el caso de KstR.

La curva de desnaturalización térmica de KstR observada en presencia de 3OChA es algo diferente a la observada con ácido palmítico o con 3OHChA, ya que presenta un perfil bimodal característico. Dicho perfil podría estar indicando que el efecto en la estructura de KstR ejercido por el compuesto 3OChA es más complejo que el ejercido por el ácido palmítico o el 3OHChA, pudiendo ser crítico para la liberación del represor KstR de su región operadora. Para comprobar esta hipótesis se analizaron mediante ensayos de retardo en gel el efecto de estos compuestos en la interacción KstR-DNA utilizando la sonda 5228FP que contiene el promotor  $P_{5228}$ . En presencia de bajas concentraciones de compuesto (1-50  $\mu$ M) sólo el 3OChA fue capaz de liberar el complejo 5228FP-KstR, y no se observó ningún efecto con el ácido palmítico y el 3OHChA. Cuando se cambiaron las condiciones del ensayo forzando la desunión (disminuyendo la concentración de proteína e incrementando la concentración de compuesto) se observó la liberación del complejo 5228FP-KstR en presencia de 1 mM de ácido palmítico. Estos datos hay que tomarlos con cautela, puesto que estos niveles

## Discusión

de inductor podrían estar por encima de los niveles fisiológicos que cabrían esperarse para el ácido palmítico en el interior celular. En cualquier caso no se observó efecto alguno con el compuesto 3OHChA lo que descarta este compuesto como inductor.

El efecto del ácido palmítico y los derivados 3OHChA y 3OCHA sobre la interacción entre el represor KstR y el promotor  $P_{Q3}$  también fueron estudiados. Al igual que ocurre con el  $P_{5228}$ , el compuesto 3OCHA es capaz de liberar el complejo KstR- $P_{Q3}$  presentando una  $K_d$  de 7.3  $\mu\text{M}$ . Sin embargo el efecto del ácido palmítico fue mucho más evidente que el caso del promotor  $P_{5228}$ , obteniéndose una  $K_d$  de 226  $\mu\text{M}$ . Es importante resaltar que los ensayos de retardo en gel realizados con la proteína KstR y la sonda que contenía el promotor  $P_{Q3}$  indicaban que la unión entre ambos es menos eficaz que la observada con el promotor nativo  $P_{5228}$ . Ésta puede ser la causa por la cual el ácido palmítico es capaz de liberar el complejo KstR- $P_{Q3}$  a concentraciones más bajas que en el caso del complejo KstR- $P_{5228}$ . En cualquier caso, la capacidad del compuesto 3OChA de liberar el complejo es mucho mejor que la del ácido palmítico, indicando que este compuesto es el mejor candidato para actuar como inductor del represor KstR *in vivo*.

Cuando se comparan los valores de las constantes de disociación aparentes ( $k_d$ ) de la interacción 3OChA-KstR, se observa que el valor obtenido a partir de los ensayos de retardo en gel con el promotor  $P_{Q3}$  (7,3  $\mu\text{M}$ ) es 15 veces menor que el estimado a partir de los ensayos de desnaturalización térmica (114  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en el caso del ácido palmítico, ocurre todo lo contrario: el valor de  $K_d$  calculado a partir de los ensayos de retardo en gel (226  $\mu\text{M}$ ) es casi 10 veces mayor que la determinada a partir de los ensayos de desnaturalización térmica (25,9  $\mu\text{M}$ ). Estos resultados indican que la afinidad con la que los efectores se unen al KstR es diferente en función de que éste se encuentre unido o no al DNA. Estas diferencias pueden deberse al hecho de que la proteína pueda encontrarse en un estado conformacional diferente en una y otra situación. Cuando el KstR se encuentra unido al DNA, la proteína podría presentar un sitio de unión más apropiado para acomodar el compuesto 3OChA, mientras que la forma libre de la proteína parece unirse mejor al ácido palmítico. El hallazgo de que 3OChA presenta una mayor afinidad por el complejo de KstR-DNA que por la proteína

KstR libre, apoya la idea de que este compuesto sea el verdadero inductor del regulón KstR.

Cabe especular aquí también con la posibilidad de que el cambio conformacional que inducen el ácido palmítico y el 3OChA son muy diferentes, y esto se ratifica por el comportamiento bimodal de la desnaturalización que se observa con este último. De esta manera solamente el 3OChA sería capaz de inducir un cambio conformacional a bajas concentraciones que afecta directa o indirectamente a la región de unión al DNA (región N-terminal). Este cambio conformacional a bajas concentraciones no perceptible en cuanto a la desnaturalización térmica si que afectaría a la unión de KstR al DNA. Una prueba adicional a favor de esta teoría es que el 3OChA induce un cambio más drástico en el contenido de hélice  $\alpha$  en KstR que el ácido palmítico. Profundizando en esta hipótesis, el perfil bimodal observado en la desnaturalización de la proteína KstR en presencia de 3OChA podría deberse a que la unión de este compuesto produce cambios conformacionales diferentes en los dos dominios de la proteína: el dominio de unión al sustrato y el dominio de unión a DNA. Estos cambios estructurales podrían ocasionar que cada uno de los dominios desnaturalice de forma diferente dando como resultado las dos transiciones observadas en los experimentos de desnaturalización térmica.

La necesidad de que la molécula inductora produzca un cambio conformacional específico en la estructura de un regulador para que éste se libere del DNA, ha sido puesto de manifiesto en otros reguladores TetR. Por ejemplo, en el caso del represor QacR de *S. aureus*, en el que la unión del inductor provoca que una región desordenada próxima a la hélice  $\alpha 5$  se ordene en forma de  $\alpha$ -hélice afectando la conformación de la hélice  $\alpha 6$ . Para mantener las interacciones que ésta última establece con la hélice  $\alpha 1$  del dominio de unión a DNA, dicho dominio se ve obligado a rotar, por lo que la disposición de las hélices  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  del dominio HTH se modifica y se produce la liberación de la proteína del DNA (Schumacher *et al.*, 2001). Bajo este supuesto, el ácido palmítico, el ácido oleico y el compuesto 3OHChA se unirían al represor KstR debido a su homología estructural con 3OChA (cadena hidrofóbica larga y un grupo carboxilo), pero no serían

## Discusión

capaces de inducir el cambio conformacional específico en el dominio de unión al DNA necesario para liberar el complejo KstR-DNA.

La imposibilidad de comprobar el efecto represor del KstR mediante experimentos de transcripción *in vitro* con los promotores nativos de *M. smegmatis* llevó a la construcción del promotor artificial  $P_{Q3}$ , que contiene las cajas -35 y -10 del promotor  $P_{lacUV5}$  de *E. coli* y la secuencia correspondiente a la caja operadora del represor KstR. Existen numerosos ejemplos de promotores micobacterianos que no presentan actividad en *E. coli* (Das Gupta *et al.*, 1993; Barker *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2005) y se ha sugerido que la falta de reconocimiento de estos promotores por parte de la RNA polimerasa de *E. coli* es debida a su bajo grado de homología en la región -35 con respecto a los promotores de *E. coli* (Bashyam *et al.*, 1996). El promotor  $P_{Q3}$  interacciona con la RNAP de *E. coli* mucho mejor de los que lo hace el promotor nativo  $P_{5228}$  de *M. smegmatis* poniendo de manifiesto las diferencias entre los promotores de estas dos especies. Mediante los experimentos de transcripción *in vitro* se ha demostrado que el promotor artificial  $P_{Q3}$  es capaz de dirigir la transcripción utilizando la RNAP de *E. coli* y que dicha transcripción se inhibe en presencia del represor KstR. La adición de 3OChA recupera los niveles de transcripción obtenidos en ausencia de KstR, mientras que ni el ácido palmítico ni el 3OHChA ejercen ningún efecto en la activación de la transcripción.

Estos resultados demuestran por primera vez que el compuesto 3OChA (ácido 4-colesten-3-ona-26-oico), un compuesto intermedio de la degradación de la cadena lateral del colesterol producido por los citocromos CYP125 y CYP142, funciona como el verdadero inductor del represor KstR permitiendo la expresión de los genes implicados en el metabolismo del colesterol. Además se ha puesto de manifiesto la validez del promotor artificial  $P_{Q3}$  como una herramienta útil para estudiar los mecanismos de la regulación transcripcional mediada por KstR. La construcción de un promotor que responde a esteroides, abre el camino hacia el desarrollo de nuevos biosensores que puedan ser utilizados como sistemas de detección de estas moléculas altamente hidrofóbicas.

Las razones por las que algunos sistemas de regulación seleccionan un metabolito intermedio como inductor en lugar del sustrato inicial de la ruta no están muy claras. Una posibilidad es que el compuesto 3OChA haya sido seleccionado como inductor del regulador KstR en lugar del colesterol o la colestenoína debido a su mayor solubilidad, una propiedad que debería facilitar su difusión citoplásmica para llegar a los múltiples promotores regulados por KstR que se distribuyen en diferentes regiones del cromosoma. Existen más ejemplos en la naturaleza de reguladores bacterianos que responden a compuestos esteroideos. Es el caso de los represores CmeR de *Campylobacter jejuni* y BreR de *Vibrio cholerae*, que reconocen los ácidos biliares como inductores y regulan la expresión de genes que codifican bombas de flujo cuya función es el transporte de estos compuestos al exterior celular incrementando la resistencia a estos esteroide por parte de las células (Lin *et al.*, 2005a; Lin *et al.*, 2005b; Cerda-Maira *et al.*, 2008). Es curioso que estos inductores sean también ácidos esteroídicos, lo que apoya la hipótesis de la necesidad de la mayor solubilidad.

En este trabajo se ha demostrado que el ácido palmítico se une a la proteína KstR causando una disminución de su contenido de  $\alpha$ -hélice y reduciendo su estabilidad térmica, sin embargo no produce la activación de la transcripción de un promotor regulado por KstR, al menos en condiciones *in vitro*. En este sentido, en los experimentos de *microarrays* llevados a cabo en *M. tuberculosis* (Schnappinger *et al.*, 2003) en presencia de ácido palmítico, se observó la inducción de algunos genes (*fadD19*, *echA19* y *fadA5*) que también se encuentran inducidos en presencia de colesterol (Nesbitt *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2011; Wilbrink *et al.*, 2011) y están regulados por KstR (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012). Algunas de las enzimas codificadas por estos genes han sido recientemente caracterizadas, demostrándose su implicación en los procesos de oxidación de la cadena lateral del colesterol. La enzima FadD19 se ha identificado recientemente como un esteroide-CoA ligasa esencial para la degradación de esteroides de 24 átomos de en *R. rhodochrous* DSM43269 (Wilbrink *et al.*, 2011) y FadA5 ha sido propuesta como un  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa responsable de la escisión tiolítica que tiene lugar al final de cada ciclo de -



oxidación de la cadena lateral del colesterol, y por tanto necesaria para la formación de AD y ADD (Nesbitt *et al.*, 2010). El hecho de que estos genes regulados por KstR (Kendall *et al.*, 2007; Uhía *et al.*, 2012) estuvieran inducidos tanto en presencia de colesterol como de ácido palmítico fue la clave que llevó a verificar si el ácido palmítico podía ser el inductor de KstR mediante los diferentes experimentos *in vitro* mostrados en el capítulo 2 de Resultados.

Para confirmar estos experimentos, se analizó mediante qRT-PCR la expresión en presencia de ácido palmítico de algunos de los genes pertenecientes al regulón KstR y que se encuentran inducidos en colesterol en *M. smegmatis* (*kstD*, *KshA*, *cyp125*, *fadA5*). Ninguno de estos genes se inducía en presencia de ácido palmítico, lo que sugiere que el efecto observado en los *microarrays* podría ser un artefacto. Este tipo de artefactos en los *microarrays* se produce como consecuencia de la similitud que existe entre los genes que ejercen funciones similares en una misma bacteria. De esta manera los mensajeros inducidos por el ácido palmítico, muchos de ellos relacionados con genes de la  $\beta$ -oxidación son similares a los genes de implicados en la  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral del colesterol y por lo tanto pueden presentar hibridación cruzada en los *microarrays*, sugiriendo así una inducción que realmente no existe. Por ello, la única manera de verificar si existe inducción real cuando se trata de genes metabólicos muy similares es utilizando sondas más específicas en qRT-PCR. Sin embargo, y a pesar de estos argumentos, no puede descartarse la posibilidad de que el ácido palmítico u otros ácidos similares presentes en micobacterias desempeñen algún papel en la expresión de los genes del regulón *kstR*, pudiendo competir con el 3OChA en el sitio de unión al efector de la proteína KstR, ejerciendo así un papel de anti-inductor en determinadas circunstancias metabólicas.

#### **4. Implicación de las primeras etapas de la degradación del colesterol en el control transcripcional de la ruta**

---

En el trabajo aquí presentado se demuestra por primera vez que el ácido 4-cholesten-3-ona-26-oico (3OChA), producto final de las reacciones llevadas a cabo por la

acción coordinada de la colesterol deshidrogenasas/isomerasas (3- $\beta$ -HSD o SDR) y los citocromos P450 (CYP125A3 o CYP142A2) en *M. smegmatis*, es el encargado de activar la transcripción de los genes regulados por KstR, y no el colesterol ni la colestenoa como se ha habido asumido inicialmente. Por tanto, para que se produzca una pequeña cantidad de 3OChA que dispare la expresión de los genes del regulón de KstR es necesario que exista un nivel basal de las enzimas que realizan las primeras etapas de la degradación del colesterol, es decir, que se lleve a cabo la oxidación del carbono C3 por parte de las enzimas 3- $\beta$ -HSD o SDR, que conllevan la formación de colestenoa (Uhía *et al.*, 2011), y la oxidación del C26 de la cadena lateral de la colestenoa realizado por los citocromos CYP125 o CYP142 que conlleva la producción del ácido 3OChA.

El gen *MSMEG\_5228* que codifica la enzima 3- $\beta$ -HSD no presenta una inducción diferencial muy elevada en presencia de colesterol con respecto a glicerol (Uhía *et al.*, 2012), ya que sus niveles basales son relativamente altos. Esto indica que la represión ejercida por KstR sobre el promotor de este gen (*P<sub>5228</sub>*) sufre un importante escape. En este sentido y para reforzar esta hipótesis es importante señalar que en el caso de *M. tuberculosis* el gen *Rv1106c* que codifica esta misma enzima no está regulado por KstR (Yang *et al.*, 2007; Nesbitt *et al.*, 2010). Además, tanto en *M. smegmatis* como en algunas de las especies del género *Rhodococcus*, las enzimas que catalizan la transformación de colesterol en colestenoa son muy redundantes (Fernández de las Heras *et al.*, 2011; Uhía *et al.*, 2011) y en cierta manera inespecíficas, lo que implica un menor control de su expresión. Este menor control del represor KstR sobre esta primera etapa en la degradación del colesterol y la elevada redundancia de las enzimas que lo llevan a cabo pone de manifiesto la necesidad de que este paso tenga lugar de una manera rápida una vez que el colesterol entra en la célula para que se genere el inductor y la consiguiente activación del resto de los genes de la ruta.

Como se ha demostrado en este trabajo, también existe una elevada redundancia en el genoma de *M. smegmatis* de los citocromos P450 encargados de oxidación del C26 de la cadena lateral del colesterol y la colestenoa y por tanto una gran variedad de alternativas catalíticas para llevar a cabo la producción del compuesto

## Discusión

3OChA. Esto garantiza la inducción de la ruta aunque alguno de ellos esté alterado o se encuentre en un nivel bajo de expresión. La capacidad de crecer en colesterol y/o colesteno del doble mutante  $\Delta\text{Cyp125}\Delta\text{Cyp142}$  y el hecho de que los genes que codifican enzimas implicadas en la ruta alta de la degradación de estos compuestos se encuentren inducidos en este mutante ha sugerido la existencia de al menos otro citocromo capaz de realizar las mismas reacciones llevadas a cabo por CYP125A3 o el CYP42A2.

Sabíamos que el mutante *M. smegmatis*::*MSMEG\_5995* que presenta una inserción en el gen *MSMEG\_5995* que codifica el citocromo CYP125, no crece en colesterol como única fuente de carbono, ya que este mutante por inserción presenta efectos polares sobre el resto de genes del operón *igr* que contiene el gen del citocromo (Uhía, 2010). Dado que este operon está implicado en la degradación de la cadena lateral del colesterol su alteración impide que la bacteria pueda crecer en colesterol. Esto mismo sucede en el mutante  $\Delta\text{igr}$  de *M. tuberculosis* (Chang et al., 2009). La diferencia de crecimiento entre el mutante por inserción de *M. smegmatis*::*MSMEG\_5995* y el mutante de delección doble  $\Delta\text{cyp125}\Delta\text{cyp142}$ , que no tiene afectada la degradación de la cadena lateral, sugiere que en *M. smegmatis* es necesario que se produzca la degradación completa de la cadena lateral para que tenga lugar la degradación del resto de la molécula y se pueda obtener de ella el carbono y la energía suficientes para crecer.

Actualmente existe una cierta incertidumbre sobre el orden en el que tiene lugar la degradación de la cadena lateral y de los anillos en las diferentes bacterias degradadoras de colesterol. En el caso de *M. tuberculosis*, al igual que se ha sugerido aquí para *M. smegmatis*, la hipótesis más barajada es que para que puedan comenzar a degradarse los anillos es necesario que la cadena lateral esté completamente metabolizada. La presencia de AD y ADD en extractos de *M. tuberculosis* (Nesbitt et al., 2010), así como la preferencia de las enzimas ChsE1 y ChsE2, implicadas en el último ciclo de  $\beta$ -oxidación de la cadena lateral, por sustratos con el sistema de anillos intacto (Thomas et al., 2011; Thomas and Sampson, 2013), apoyan esta teoría. Sin embargo,

existen otros trabajos que proponen que la degradación de los anillos y la cadena lateral puede ocurrir de manera simultánea en esta cepa basándose en el hecho de que el complejo hidrolasa, constituido por las proteínas KshA/KshB, que cataliza la 9 - hidroxilación del AD y ADD en los primeros pasos de la degradación de los anillos, parece ser más eficaz frente a metabolitos con la cadena lateral parcialmente degradada (Capyk *et al.*, 2011).

En el caso de otras actinobacterias, como por ejemplo en el género *Rhodococcus*, tampoco está muy claro el orden del proceso. Empleando la cepa *R. rhodochrous* RG32 (mutante de *R. rhodochrous* DSM43269 que tiene bloqueada la degradación de los anillos y por tanto acumula ADD), se generó un mutante RG32 $\Delta$ cyp125, el cual no era capaz de degradar la cadena lateral del colesterol y por tanto no se producía la acumulación de ADD cuando se crecía en presencia de colesterol. Sin embargo, éste era transformado en colesteno y 1,4-colestadien-3-ona los cuales se acumulaban en el medio de cultivo (Rosłonec *et al.*, 2009). Esto indica, por un lado, que en esta cepa los citocromos de oxidación de la cadena lateral del colesterol no son redundantes, y por lo tanto el citocromo CYP125 es absolutamente imprescindible para la oxidación del C26, y por otro lado, que la oxidación del C3 y la deshidrogenación en C1 tienen lugar independientemente de que la cadena lateral comience a degradarse. Curiosamente, el mutante  $\Delta$ cyp125 de *R. jostii* RHA1 no crece en colesterol como le ocurre al mutante de *R. rhodochrous* RG32 pero sin embargo, a diferencia de este no es capaz de transformar 3-hidroxiesteroides, es decir que no lleva a cabo las oxidaciones del anillo A. Todo esto sugiere un comportamiento diferencial de las enzimas en las dos cepas de *Rhodococcus*. Más aún, cuando al mutante de *R. jostii* se le suministra colesteno, es capaz de crecer con este compuesto, observándose producción de intermediarios derivados de la degradación de los anillos A y B. Todo esto indica que, para que pueda oxidarse el C3, es necesario que la cadena lateral haya comenzado a degradarse, al menos parcialmente, pero cuando el C3 ya está oxidado, la degradación de los anillos A y B sí que puede tener lugar. Estas diferencias entre los diferentes microorganismos ponen de manifiesto que el orden en la oxidación de los

## Discusión

anillos y la oxidación de la cadena lateral está sujeta a una gran variabilidad entre las diferentes especies, que probablemente responde a la especificidad de las enzimas de apertura de los anillos que son capaces o no de reconocer sustratos con o sin la cadena lateral.

A la vista de la aparente heterogeneidad de comportamiento y especificidad de las enzimas que catalizan los primeros pasos de la ruta de degradación del colesterol y en concreto la oxidación de los carbonos C3 y C26 cabe preguntarse como se coordinan estos pasos en las diferentes bacterias degradadoras de colesterol para controlar el regulón de *kstR*, que se supone debería estar controlado en todos los casos por la producción de 3OChA. En este sentido el caso del mutante *Δcyp125* de *R. jostii* RHA1 antes citado resulta sorprendente, ya que parece que es capaz de utilizar enzimas de la ruta del colesterol para degradar la colestenoína aunque aparentemente no puede formar 3OChA. Este comportamiento lo que parece sugerir es que al menos en algunos organismos los niveles basales de las enzimas de la ruta pueden ser suficientes para degradar el colesterol y por lo tanto la activación de la ruta es exclusivamente necesaria para aumentar la eficacia en condiciones de abundancia. En cualquier caso a la vista de los resultados presentados en esta tesis algunos de los experimentos contradictorios realizados en las distintas cepas de *Rhodococcus* necesitarían ser revisados.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral proporcionan nuevos conocimientos sobre las primeras etapas del metabolismo del colesterol en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 y ponen de manifiesto la importancia de estas reacciones en la regulación transcripcional de esta ruta catabólica en micobacterias. El descubrimiento de que el 3OChA es la molécula inductora responsable de la activación de los genes implicados en la degradación del colesterol en estas bacterias es de vital importancia porque nos ayuda a entender como se coordina el metabolismo y la regulación y de esta manera se abre la puerta al desarrollo de nuevas estrategias encaminadas a combatir la tuberculosis.

## **VII.CONCLUSIONES**



El trabajo descrito en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes conclusiones principales:

1. Los genes *MSMEG\_5995* y *MSMEG\_5918* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 codifican los citocromos P450 CYP125A3 y CYP142A2, respectivamente, que catalizan los tres primeros pasos de oxidación de la cadena lateral del colesterol y la colestenona, produciendo los ácidos 5-colesten-3 $\beta$ -ol-26-oico (3OHChA) y 4-colesten-3-ona-26-oico (3OChA).
2. El citocromo CYP125A3 tiene una mayor implicación fisiológica en la oxidación de la cadena lateral del colesterol y la colestenona que el citocromo CYP142A2, ya que la inactivación mediante delección del gen que codifica el CYP125A3 ( $\Delta$ Cyp125) produce un ligero incremento de la tasa de duplicación de la bacteria cuando crece en estos esteroides como única fuente de carbono, mientras que el mutante de delección del gen que codifica el CYP142A2 ( $\Delta$ Cyp142) presenta una tasa de duplicación igual a la de la cepa silvestre.
3. La delección simultánea de los dos citocromos CYP125A3 y CYP142A2 ( $\Delta$ Cyp125- $\Delta$ Cyp142) produce un importante incremento de la tasa de duplicación de esta bacteria cuando crece en colesterol o colestenona como única fuente de carbono. La capacidad de crecimiento de este mutante pone de manifiesto la existencia de al menos un tercer citocromo P450 capaz de realizar la misma reacción bioquímica catalizada por los citocromos CYP125A3 y CYP142A2.
4. Los ácidos palmítico, 3OHChA y 3OChA se unen específicamente al regulador KstR, produciendo cambios conformacionales en su estructura que conllevan una disminución de su contenido en  $\alpha$ -hélice y una reducción de su estabilidad térmica.



## Conclusiones

5. El ácido 3OChA funciona como el verdadero inductor del represor KstR, activando la transcripción de los genes del regulon *kstR* implicados en la ruta alta y central del catabolismo del colesterol.

## **VIII.BIBLIOGRAFÍA**



- Ahmad, Z., Sharma, S. and Khuller, G. K. (2006a).** The potential of azole antifungals against latent/persistent tuberculosis. *FEMS Microbiology Letters* **258**(2), 200-203.
- Ahmad, Z., Sharma, S., Khuller, G. K., Singh, P., Faujdar, J. and Katoch, V. M. (2006b).** Antimycobacterial activity of econazole against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**(6), 543-544.
- Andor, A., Jekkel, A., Hopwood, D. A., Jeanplong, F., Ilkőy, É., Kónya, A., Kurucz, I. and Ambrus, G. (2006).** Generation of Useful Insertionally Blocked Sterol Degradation Pathway Mutants of Fast-Growing Mycobacteria and Cloning, Characterization, and Expression of the Terminal Oxygenase of the 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -Hydroxylase in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(10), 6554-6559.
- Arruda, S., Bomfim, G., Knights, R., Huima-Byron, T. and Riley, L. W. (1993).** Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* **261**(5127), 1454-1457.
- Arya, S. K., Datta, M. and Malhotra, B. D. (2008).** Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **23**(7), 1083-1100.
- Auclair, K., Moënné-Loccoz, P. and Ortiz de Montellano, P. R. (2001).** Roles of the Proximal Heme Thiolate Ligand in Cytochrome P450cam. *Journal of the American Chemical Society* **123**(21), 4877-4885.
- Av-Gay, Y. and Sobouti, R. (2000).** Cholesterol is accumulated by mycobacteria but its degradation is limited to non-pathogenic fast-growing mycobacteria. *Canadian journal of microbiology* **46**(9), 826-831.
- Barker, L. P., Porcella, S. F., Wyatt, R. G. and Small, P. L. C. (1999).** The *Mycobacterium marinum* G13 promoter is a strong sigma 70-like promoter that is expressed in *Escherichia coli* and mycobacteria species. *FEMS Microbiology Letters* **175**(1), 79-85.
- Barnes, H. J., Arlotto, M. P. and Waterman, M. R. (1991).** Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17  $\alpha$ -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**(13), 5597-5601.
- Bashyam, M. D., Kaushal, D., Dasgupta, S. K. and Tyagi, A. K. (1996).** A study of mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *Journal of Bacteriology* **178**(16), 4847-4853.
- Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. G. M. (2006).** Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(3), 1729-1738.
- Bellamine, A., Mangla, A. T., Nes, W. D. and Waterman, M. R. (1999).** Characterization and catalytic properties of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(16), 8937-8942.
- Bernhardt, R. (2006).** Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology* **124**(1), 128-145.
- Bertrand, K. P., Postle, K., Wray Jr, L. V. and Reznikoff, W. S. (1983).** Overlapping divergent promoters control expression of Tn10 tetracycline resistance. *Gene* **23**(2), 149-156.
- Björkhem, I. and Eggertsen, G. (2001).** Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Current Opinion in Lipidology* **12**(2), 97-103.
- Böhm, G., Muhr, R. and Jaenicke, R. (1992).** Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering* **5**(3), 191-195.

## Bibliografia

- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brzostek, A., Śliwiński, T., Rumijowska-Galewicz, A., Korycka-Machała, M. and Dziadek, J. (2005).** Identification and targeted disruption of the gene encoding the main 3-ketosteroid dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **151**(7), 2393-2402.
- Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B. and Dziadek, J. (2009).** *Mycobacterium tuberculosis* Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. **191**(21), 6584-6591.
- Brzostek, A., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B., Wojcik, E. A. and Dziadek, J. (2013).** ChoD and HsdD can be dispensable for cholesterol degradation in mycobacteria. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **134**(0), 1-7.
- Byrne, S. T., Denkin, S. M., Gu, P., Nuermberger, E. and Zhang, Y. (2007).** Activity of ketoconazole against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and in the mouse model. *Journal of Medical Microbiology* **56**(8), 1047-1051.
- Capyk, J. K., Casabon, I., Gruninger, R., Strynadka, N. C. and Eltis, L. D. (2011).** Activity of 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -Hydroxylase (KshAB) Indicates Cholesterol Side Chain and Ring Degradation Occur Simultaneously in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **286**(47), 40717-40724.
- Capyk, J. K., D'Angelo, I., Strynadka, N. C. and Eltis, L. D. (2009a).** Characterization of 3-Ketosteroid 9 $\alpha$ -Hydroxylase, a Rieske Oxygenase in the Cholesterol Degradation Pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* **284**(15), 9937-9946.
- Capyk, J. K., Kalscheuer, R., Stewart, G. R., Liu, J., Kwon, H., Zhao, R., Okamoto, S., Jacobs, W. R., Eltis, L. D. and Mohn, W. W. (2009b).** Mycobacterial Cytochrome P450 125 (Cyp125) Catalyzes the Terminal Hydroxylation of C27 Steroids. *Journal of Biological Chemistry* **284**(51), 35534-35542.
- Carette, X., Blondiaux, N., Willery, E., Hoos, S., Lecat-Guillet, N., Lens, Z., Wohlkönig, A., Wintjens, R., Soror, S. H., Frénois, F., Dirie, B., Villeret, V., England, P., Lippens, G., Deprez, B., Locht, C., Willand, N. and Baulard, A. R. (2012).** Structural activation of the transcriptional repressor EthR from *Mycobacterium tuberculosis* by single amino acid change mimicking natural and synthetic ligands. *Nucleic Acids Research* **40**(7), 3018-3030.
- Casali, N. and Riley, L. (2007).** A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. *BMC Genomics* **8**(1), 60.
- Cerda-Maira, F. A., Ringelberg, C. S. and Taylor, R. K. (2008).** The Bile Response Repressor BreR Regulates Expression of the *Vibrio cholerae* breAB Efflux System Operon. *Journal of Bacteriology* **190**(22), 7441-7452.
- Chang, J. C., Harik, N. S., Liao, R. P. and Sherman, D. R. (2007).** Identification of Mycobacterial Genes That Alter Growth and Pathology in Macrophages and in Mice. *Journal of Infectious Diseases* **196**(5), 788-795.
- Chang, J. C., Miner, M. D., Pandey, A. K., Gill, W. P., Harik, N. S., Sassetti, C. M. and Sherman, D. R. (2009).** igr Genes and *Mycobacterium tuberculosis* Cholesterol Metabolism. *Journal of Bacteriology* **191**(16), 5232-5239.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z. and Hu, J. (2011).** Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Research* **45**(2), 732-740.

- Dam, J. and Schuck, P. (2005).** Sedimentation Velocity Analysis of Heterogeneous Protein-Protein Interactions: Sedimentation Coefficient Distributions  $c(s)$  and Asymptotic Boundary Profiles from Gilbert-Jenkins Theory. *Biophysical Journal* **89**(1), 651-666.
- Das Gupta, S. K., Bashyam, M. D. and Tyagi, A. K. (1993).** Cloning and assessment of mycobacterial promoters by using a plasmid shuttle vector. *Journal of Bacteriology* **175**(16), 5186-5192.
- Daughton, C. G. y Ternes, T. A. (1999).** Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environ Health Perspect* **107**, 907-938.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. and Timmis, K. N. (1990).** Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology* **172**(11), 6568-6572.
- Demain, A. L. (1992).** Microbial secondary metabolism: a new theoretical frontier for academia, a new opportunity for industry. *Ciba Found symp* **171**, 3-16.
- Dresen, C., Lin, L. Y.-C., D'Angelo, I., Tocheva, E. I., Strynadka, N. and Eltis, L. D. (2010).** A Flavin-dependent Monooxygenase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Cholesterol Catabolism. *Journal of Biological Chemistry* **285**(29), 22264-22275.
- Driscoll, M. D., McLean, K. J., Levy, C., Mast, N., Pikuleva, I. A., Lafite, P., Rigby, S. E. J., Leys, D. and Munro, A. W. (2010).** Structural and Biochemical Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP142: Evidence for multiple cholesterol 27-hydroxylase activities in a human pathogen. *Journal of Biological Chemistry* **285**(49), 38270-38282.
- Dunford, A. J., McLean, K. J., Sabri, M., Seward, H. E., Heyes, D. J., Scrutton, N. S. and Munro, A. W. (2007).** Rapid P450 Heme Iron Reduction by Laser Photoexcitation of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 and CYP51B1: Analysis of co complexation reactions and reversibility of the P450/P420 equilibrium. *Journal of Biological Chemistry* **282**(34), 24816-24824.
- Fernandes, P., Cruz, A., Angelova, B., Pinheiro, H. M. and Cabral, J. M. S. (2003).** Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology* **32**(6), 688-705.
- Fernández de las Heras, L., Mascaraque, V., García Fernández, E., Navarro-Llorens, J. M., Perera, J. and Drzyzga, O. (2011).** ChoG is the main inducible extracellular cholesterol oxidase of *Rhodococcus* sp. strain CECT3014. *Microbiological Research* **166**(5), 403-418.
- Gagné, F., Blaise, C. and André, C. (2006).** Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**(3), 329-336.
- García, J. L., Uhía, I. and Galán, B. (2012).** Catabolism and biotechnological applications of cholesterol degrading bacteria. *Microbial Biotechnology* **5**(6), 679-699.
- Gatfield, J. y Pieters, J. (2000).** Essential Role for Cholesterol in Entry of Mycobacteria into Macrophages. *Science* **288**, 1647-1651.
- George, A.M. y Levy, S.B. (1983).** Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J Bacteriol* **155**, 541-548.
- Griffin, J. E., Gawronski, J. D., DeJesus, M. A., Ioerger, T. R., Akerley, B. J. and Sassetti, C. M. (2011).** High-Resolution Phenotypic Profiling Defines Genes Essential for Mycobacterial Growth and Cholesterol Catabolism. *PLoS Pathog* **7**(9), e1002251.

## Bibliografia

- Griffin, Jennifer E., Pandey, Amit K., Gilmore, Sarah A., Mizrahi, V., McKinney, John D., Bertozzi, Carolyn R. and Sassetti, Christopher M. (2012).** Cholesterol Catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* Requires Transcriptional and Metabolic Adaptations. *Chemistry & biology* **19**(2), 218-227.
- Gu, R., Su, C.-C., Shi, F., Li, M., McDermott, G., Zhang, Q. and Yu, E. W. (2007).** Crystal Structure of the Transcriptional Regulator CmeR from *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Biology* **372**(3), 583-593.
- Guengerich, F. P. (1991).** Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **266**(16), 10019-10022.
- Hanselman, T. A., Graetz, D. A. y Wilkie, A. C. (2003).** Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environ Sci Technol* **37**, 5471-5478.
- Harder, J. and Probian, C. (1997).** Anaerobic mineralization of cholesterol by a novel type of denitrifying bacterium. *Arch Microbiol* **167**, 269-274.
- Hayami, M., Okabe, A., Sasai, K., Hayashi, H. y Kanemasa, Y. (1979).** Presence and synthesis of cholesterol in stable staphylococcal L-forms. *J Bacteriol* **140**, 859-863.
- Hudson, S. A., McLean, K. J., Munro, A. W. and Abell, C. (2012).** *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 enzymes: a cohort of novel TB drug targets. *Biochemical Society Transactions* **4** (3)
- Huffman, J. L. and Brennan, R. G. (2002).** Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Current Opinion in Structural Biology* **12**(1), 98-106.
- Insin, E. M. and Guengerich, F. P. (2007).** Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1770**(3), 314-329.
- Jackson, M., Reinaldo Camacho, L., Gicquel, B. and Guilhot, C. (2001).** Gene Replacement and Transposon Delivery Using the Negative Selection Marker *sacB*. *Mycobacterium tuberculosis Protocols* T. Parish and N. Stoker, Humana Press. **54**: 59-75.
- Jain, V., Sujatha, S., Ojha, A. K. and Chatterji, D. (2005).** Identification and characterization of *rel* promoter element of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* **351**(0), 149-157.
- JCBN (1989).** Nomenclature of steroids. *Pure & Appl Chem* **61**, 1783-1822.
- Jefcoate, C. R., Orme-Johnson, W. H. and Beinhert, H. (1976).** Cytochrome P-450 of bovine adrenal mitochondria. Ligand binding to two forms resolved by EPR spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **251**(12), 3706-3715.
- Johnston, J. B., Ouellet, H. and de Montellano, P. R. O. (2010).** Functional Redundancy of Steroid C26-monooxygenase Activity in *Mycobacterium tuberculosis* Revealed by Biochemical and Genetic Analyses. *Journal of Biological Chemistry* **285**(47), 36352-36360.
- Joshi, S. M., Pandey, A. K., Capite, N., Fortune, S. M., Rubin, E. J. and Sassetti, C. M. (2006).** Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(31), 11760-11765.
- Jubete, E., Loaiza, O. A., Ochoteco, E., Pomposo, J. A., Grande, H., Rodr, #237 and guez, J. (2009).** Nanotechnology: A Tool for Improved Performance on Electrochemical Screen-Printed (Bio)Sensors. *Journal of Sensors* **2009**.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. and Price, N. C. (2005).** How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1751**(2), 119-139.

- Kendall, S. L., Withers, M., Soffair, C. N., Moreland, N. J., Gurcha, S., Sidders, B., Frita, R., Ten Bokum, A., Besra, G. S., Lott, J. S. and Stoker, N. G. (2007). A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **65**(3), 684-699.
- Kendall, S. L., Burgess, P., Balhana, R., Withers, M., ten Bokum, A., Lott, J. S., Gao, C., Uhia-Castro, I. and Stoker, N. G. (2010). Cholesterol utilization in mycobacteria is controlled by two TetR-type transcriptional regulators: kstR and kstR2. *Microbiology* **156**(5), 1362-1371.
- Klepp, L. I., Forrellad, M. A., Osella, A. V., Blanco, F. C., Stella, E. J., Bianco, M. V., Santangelo, M. d. I. P., Sassetti, C., Jackson, M., Cataldi, A. A., Bigi, F. and Morbidoni, H. R. (2012). Impact of the deletion of the six mce operons in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbes and Infection* **14**(7-8), 590-599.
- Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**(2), 376-386.
- Lack, N. A., Yam, K. C., Lowe, E. D., Horsman, G. P., Owen, R. L., Sim, E. and Eltis, L. D. (2010). Characterization of a Carbon-Carbon Hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Cholesterol Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **285**(1), 434-443.
- Lamb, D. C., Kelly, D. E., Manning, N. J. and Kelly, S. L. (1998). A sterol biosynthetic pathway in *Mycobacterium*. *FEBS Letters* **437**(1-2), 142-144.
- Lamberti, Y., Perez Vidakovics, M. L., van der Pol, L.-W. y Rodríguez, M. E. (2008). Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microb Pathog* **44**, 501-511.
- Lee, L. S., Strock, T. J., Sarmah, A. K. y Rao, P. S. C. (2003). Sorption and Dissipation of Testosterone, Estrogens, and Their Primary Transformation Products in Soils and Sediment. *Environ Sci Technol* **37**, 4098-4105.
- Leys, D., Mowat, C. G., McLean, K. J., Richmond, A., Chapman, S. K., Walkinshaw, M. D. and Munro, A. W. (2003). Atomic Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 to 1.06 Å Reveals Novel Features of Cytochrome P450. *Journal of Biological Chemistry* **278**(7), 5141-5147.
- Lin, J., Akiba, M., Sahin, O. and Zhang, Q. (2005a). CmeR Functions as a Transcriptional Repressor for the Multidrug Efflux Pump CmeABC in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(3), 1067-1075.
- Lin, J., Cagliero, C., Guo, B., Barton, Y.-W., Maurel, M.-C., Payot, S. and Zhang, Q. (2005b). Bile Salts Modulate Expression of the CmeABC Multidrug Efflux Pump in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* **187**(21), 7417-7424.
- Liong, M. T. and Shah, N. P. (2005). Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains. *Journal of Dairy Science* **88**(1), 55-66.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods* **25**(4), 402-408.
- Mahato, S. B. and Garai, S. (1997). Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids* **62**(4), 332-345.
- Majewska, M. D. (2007). Steroids and ion channels in evolution: from bacteria to synapses and mind. Evolutionary role of steroid regulation of GABA(A) receptors. *Acta Neurobiol Exp* **67**(3), 219-233.



## Bibliografia

- Malaviya, A. and Gomes, J. (2008).** Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. *Bioresource Technology* **99**(15), 6725-6737.
- Manso, I., Torres, B., Andreu, J. M., Menéndez, M., Rivas, G., Alfonso, C., Díaz, E., García, J. L. and Galán, B. (2009).** 3-Hydroxyphenylpropionate and Phenylpropionate Are Synergistic Activators of the MhpR Transcriptional Regulator from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **284**(32), 21218-21228.
- Marschall, C., Labrousse, V., Kreimer, M., Weichart, D., Kolb, A. and Hengge-Aronis, R. (1998).** Molecular analysis of the regulation of *csiD*, a carbon starvation-inducible gene in *Escherichia coli* that is exclusively dependent on  $\sigma^S$  and requires activation by cAMP-CRP. *Journal of Molecular Biology* **276**(2), 339-353.
- Mathieu, J. M., Mohn, W. W., Eltis, L. D., LeBlanc, J. C., Stewart, G. R., Dresen, C., Okamoto, K. and Alvarez, P. J. J. (2010).** 7-Ketocholesterol Catabolism by *Rhodococcus jostii* RHA1. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(1), 352-355.
- McLean, K. J., Marshall, K. R., Richmond, A., Hunter, I. S., Fowler, K., Kieser, T., Gurcha, S. S., Besra, G. S. and Munro, A. W. (2002).** Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomyces. *Microbiology* **148**(10), 2937-2949.
- McLean, K. J., Warman, A. J., Seward, H. E., Marshall, K. R., Girvan, H. M., Cheesman, M. R., Waterman, M. R. and Munro, A. W. (2006).** Biophysical Characterization of the Sterol Demethylase P450 from *Mycobacterium tuberculosis*, Its Cognate Ferredoxin, and Their Interactions†. *Biochemistry* **45**(27), 8427-8443.
- McLean, K. J., Carroll, P., Lewis, D. G., Dunford, A. J., Seward, H. E., Neeli, R., Cheesman, M. R., Marsollier, L., Douglas, P., Smith, W. E., Rosenkrands, I., Cole, S. T., Leys, D., Parish, T. and Munro, A. W. (2008).** Characterization of Active Site Structure in CYP121: A cytochrome P450 essential for viability of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Journal of Biological Chemistry* **283**(48), 33406-33416.
- McLean, K. J., Lafite, P., Levy, C., Cheesman, M. R., Mast, N., Pikuleva, I. A., Leys, D. and Munro, A. W. (2009).** The Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: Molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *Journal of Biological Chemistry* **284**(51), 35524-35533.
- Miller, W. L. (1988).** Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocrine Reviews* **9**(3), 295-318.
- Mohn, W. W., van der Geize, R., Stewart, G. R., Okamoto, S., Liu, J., Dijkhuizen, L. and Eltis, L. D. (2008).** The Actinobacterial *mce4* locus encodes a steroid transporter. *Journal of Biological Chemistry* **283**(51), 35368-35374.
- Moll, I., Grill, S., Gualerzi, C. O. and Bläsi, U. (2002).** Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Molecular Microbiology* **43**(1), 239-246.
- Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C. and Dutton, P. L. (2002).** P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome. *Trends in Biochemical Sciences* **27**(5), 250-257.
- Munro, A. W., Girvan, H. M. and McLean, K. J. (2007).** Variations on a (t)heme-novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. *Natural Product Reports* **24**(3), 585-609.
- Munro, A. W., Girvan, H. M., Mason, A. E., Dunford, A. J. and McLean, K. J. (2013).** What makes a P450 tick? *Trends in Biochemical Sciences* **38**(3), 140-150.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. (2004).** *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4 edn: Freeman, W. H.

- Nelson, D. R. (2009).** The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics* **4**(1), 59–65.
- Nesbitt, N. M., Yang, X., Fontán, P., Kolesnikova, I., Smith, I., Sampson, N. S. and Dubnau, E. (2010).** A Thiolase of *Mycobacterium tuberculosis* Is Required for Virulence and Production of Androstenedione and Androstadienedione from Cholesterol. *Infection and Immunity* **78**(1), 275-282.
- Omura, T. and Sato, R. (1962).** A New Cytochrome in Liver Microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **237**(4), PC1375-PC1376.
- Omura, T. and Sato, R. (1964).** The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes: II. Solubilization, purification, and properties. *Journal of Biological Chemistry* **239**(7), 2379-2385.
- Ooi, L.-G. and Liong, M.-T. (2010).** Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal of Molecular Sciences* **11**(6), 2499–2522.
- Orth, P., Cordes, F., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. and Hinrichs, W. (1998).** Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. *Journal of Molecular Biology* **279**(2), 439-447.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. and Hinrichs, W. (2000).** Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Mol Biol* **7**(3), 215-219.
- Ortiz de Montellano, P. R. (2005).** Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York
- Ortiz de Montellano, P. R. (2010).** Hydrocarbon Hydroxylation by Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Reviews* **110**(2), 932-948.
- Ouellet, H., Lang, J., Couture, M. and Ortiz de Montellano, P. R. (2009).** Reaction of *Mycobacterium tuberculosis* Cytochrome P450 Enzymes with Nitric Oxide. *Biochemistry* **48**(5), 863-872.
- Ouellet, H., Johnston, J. B. and Ortiz de Montellano, P. R. (2010b).** The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **493**(1), 82-95.
- Ouellet, H., Guan, S., Johnston, J. B., Chow, E. D., Kells, P. M., Burlingame, A. L., Cox, J. S., Podust, L. M. and De Montellano, P. R. O. (2010a).** *Mycobacterium tuberculosis* CYP125A1, a steroid C27 monooxygenase that detoxifies intracellularly generated cholest-4-en-3-one. *Molecular Microbiology* **77**(3), 730-742.
- Ouellet, H., Johnston, J. B. and Montellano, P. R. O. d. (2011).** Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends in microbiology* **19**(11), 530-539.
- Pandey, A. K. and Sassetti, C. M. (2008).** Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**(11), 4376-4380.
- Parish, T. and Stoker, N. G. (1998).** Mycobacteria Protocols. Totowa, N.J., Humana Press. **101**
- Parsi, Z. and Górecki, T. (2006).** Determination of ergosterol as an indicator of fungal biomass in various samples using non-discriminating flash pyrolysis. *Journal of Chromatography A* **1130**(1), 145-150.
- Pereira, D. I. A. and Gibson, G. R. (2002).** Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(9), 4689-4693.
- Perera, R., Sono, M., Sigman, J. A., Pfister, T. D., Lu, Y. and Dawson, J. H. (2003).** Neutral thiol as a proximal ligand to ferrous heme iron: Implications for heme proteins that lose cysteine thiolate ligation on reduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(7), 3641-3646.

## Bibliografia

- Peyron, P., Bordier, C., N'Diaye, E.-N. y Maridonneau-Parini, I. (2000).** Nonopsonic phagocytosis of *mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol* **165**, 5186-5191.
- Podust, L. M., Yermalitskaya, L. V., Lepesheva, G. I., Podust, V. N., Dalmasso, E. A. and Waterman, M. R. (2004).** Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 $\alpha$ -demethylase. *Structure* **12**(11), 1937-1945.
- Poole, A. J. y Cord-Ruwisch, R. (2004).** Treatment of strongflow wool scouring effluent by biological emulsion destabilisation. *Water Res* **38**, 1419-1426.
- Poulos, T. L. and Johnson, E. F. (2005).** Structure of cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* 3rd. P. R. Ortiz de Montellano, Kluwer Academic: 87-114.
- Raman, D. R., Williams, E. L., Layton, A. C., Burns, R. T., Easter, J. P., Daugherty, A. S., Mullen, M. D. y Sayler, G. S. (2004).** Estrogen content of dairy and swine wastes. *Environ Sci Technol* **38**, 3567-3573.
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R. and Tobes, R. (2005).** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **69**(2), 326-356.
- Rengarajan, J., Bloom, B. R. and Rubin, E. J. (2005).** Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23), 8327-8332.
- Rosłonec, K. Z., Wilbrink, M. H., Cpyk, J. K., Mohn, W. W., Ostendorf, M., Van Der Geize, R., Dijkhuizen, L. and Eltis, L. D. (2009).** Cytochrome P450 125 (CYP125) catalyses C26-hydroxylation to initiate sterol side-chain degradation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Molecular Microbiology* **74**(5), 1031-1043.
- Routh, M. D., Su, C.-C., Zhang, Q. and Yu, E. W. (2009).** Structures of AcrR and CmeR: Insight into the mechanisms of transcriptional repression and multi-drug recognition in the TetR family of regulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1794**(5), 844-851.
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M. y Sumpter, J. P. (1998).** Identification of estrogenic chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ Sci Technol* **32**, 1559-1565.
- Rowland, P., Blaney, F. E., Smyth, M. G., Jones, J. J., Leydon, V. R., Oxbrow, A. K., Lewis, C. J., Tennant, M. G., Modi, S., Eggleston, D. S., Chenery, R. J. and Bridges, A. M. (2006).** Crystal Structure of Human Cytochrome P450 2D6. *Journal of Biological Chemistry* **281**(11), 7614-7622.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: A laboratory manual. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sassetti, C. M. and Rubin, E. J. (2003).** Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(22), 12989-12994.
- Schenkman, J. B., Remmer, H. and Estabrook, R. W. (1967).** Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Molecular Pharmacology* **3**(2), 113-123.
- Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M. I., Liu, Y., Mangan, J. A., Monahan, I. M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P. D., Nathan, C. and Schoolnik, G. K. (2003).** Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: Insights into the phagosomal environment. *The Journal of Experimental Medicine* **198**(5), 693-704.

- Schuck, P. (2000).** Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal* **78**(3), 1606-1619.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. and Brennan, R. G. (2001).** Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**(5549), 2158-2163.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. and Brennan, R. G. (2002).** Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO J* **21**(5), 1210-1218.
- Sedlaczek, L. y Smith, L. L. (1988).** Biotransformations of Steroids. *Crit Rev Biotechnol* **7**, 187-236.
- Segal, W. and Bloch, H. (1956).** Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *Journal of Bacteriology* **72**(2), 132-141.
- Shyadehi, A. Z., Lamb, D. C., Kelly, S. L., Kelly, D. E., Schunck, W.-H., Wright, J. N., Corina, D. and Akhtar, M. (1996).** the mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* (Other Names Are: Lanosterol 14 $\alpha$ -Demethylase, P-45014DM, and CYP51). *Journal of Biological Chemistry* **271**(21), 12445-12450.
- Sih, C. J., Tai, H.-H., Tsong, Y. Y., Lee, S. S. and Coombe, R. G. (1968a).** Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIV. Pathway of cholesterol side-chain degradation. *Biochemistry* **7**(2), 808-818.
- Sih, C. J., Wang, K.-C. and Tai, H.-H. (1968b).** Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIII. C22 acid intermediates in the degradation of the cholesterol side chain. *Biochemistry* **7**(2), 796-807.
- Slaytor, M. and Bloch, K. (1965).** Metabolic Transformations of Cholestenediols. *Journal of Biological Chemistry* **240**(12), 4598-4602.
- Smith, B. D., Sanders, J. L., Porubsky, P. R., Lushington, G. H., Stout, C. D. and Scott, E. E. (2007).** Structure of the human lung cytochrome P450 2A13. *Journal of Biological Chemistry* **282**(23), 17306-17313.
- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. and Jr, W. R. J. (1990).** Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* **4**(11), 1911-1919.
- Sobel, H. and Plaut, A. (1974).** The assimilation of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology* **57**(3), 377-382.
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R. and Bloom, B. R. (1991).** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**(6326), 456-460.
- Tahlan, K., Yu, Z., Xu, Y., Davidson, A. R. and Nodwell, J. R. (2008).** Ligand recognition by ActR, a TetR-Like regulator of actinorhodin export. *Journal of Molecular Biology* **383**(4), 753-761.
- Tartoff, K. D. and Hobbs, C. A. (1987).** Improved media for growing plasmid and cosmid clones, Bethesda Research Laboratories. **9:12**
- Thomas, S. T., VanderVen, B. C., Sherman, D. R., Russell, D. G. and Sampson, N. S. (2011).** Pathway profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: Elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **286**(51), 43668-43678.
- Thomas, S. T. and Sampson, N. S. (2013).** *Mycobacterium tuberculosis* utilizes a unique heterotetrameric structure for dehydrogenation of the cholesterol side chain. *Biochemistry*.

## Bibliografía

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**(22), 4673-4680.
- Tsai, R., Yu, C. A., Gunsalus, I. C., Peisach, J., Blumberg, W., Orme-Johnson, W. H. and Beinert, H. (1970).** Spin-state changes in cytochrome P-450cam on binding of specific substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **66**(4), 1157-1163.
- Uhía, I. (2010).** Análisis genético y bioquímico del catabolismo del colesterol en *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. Tesis Doctoral. (Universidad Complutense de Madrid).
- Uhía, I., Galán, B., Morales, V. and García, J. L. (2011a).** Initial step in the catabolism of cholesterol by *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. *Environmental Microbiology* **13**(4), 943-959.
- Uhía, I., Galán, B., Medrano, F. J. and García, J. L. (2011b).** Characterization of the KstR-dependent promoter of the gene for the first step of the cholesterol degradative pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **157**(9), 2670-2680.
- Uhía, I., Galán, B., Kendall, S. L., Stoker, N. G. and García, J. L. (2012).** Cholesterol metabolism in *Mycobacterium smegmatis*. *Environmental Microbiology Reports* **4**(2), 168-182.
- Urlacher, V. B. and Girhard, M. (2012).** Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends in Biotechnology* **30**(1), 26-36.
- Usman and Hosono, A. (1999).** Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of Dairy Science* **82**(2), 243-248.
- Van der Geize, R., Yam, K., Heuser, T., Wilbrink, M. H., Hara, H., Anderton, M. C., Sim, E., Dijkhuizen, L., Davies, J. E., Mohn, W. W. and Eltis, L. D. (2007).** A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(6), 1947-1952.
- Veiga, P., Juste, C., Lepercq, P., Saunier, K., Béguet, F. and Gérard, P. (2005).** Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS Microbiology Letters* **242**(1), 81-86.
- Warrilow, A. G., Parker, J. E., Kelly, D. E. and Kelly, S. L. (2013).** Azole affinity of sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**(3), 1352-1360.
- Weeks, O. B. y Francesconi, M. D. (1978).** Occurrence of squalene and sterols in *Cellulomonas dehydrogenans* (Arnaudi 1942) comb. nov. Hester 1971. *J Bacteriol* **136**, 614-624.
- Whitehouse, C. J. C., Bell, S. G. and Wong, L.-L. (2012).** P450BM3 (CYP102A1): connecting the dots. *Chemical Society Reviews* **41**(3), 1218-1260.
- Wilbrink, M. H., Petrusma, M., Dijkhuizen, L. and van der Geize, R. (2011).** FadD19 of *Rhodococcus rhodochrous* DSM43269, a Steroid-Coenzyme A Ligase Essential for Degradation of C-24 Branched Sterol Side Chains. *Applied and Environmental Microbiology* **77**(13), 4455-4464.
- Williams-Smith, D. L. and Cammack, R. (1977).** Oxidation-reduction potentials of cytochromes P-450 and ferredoxin in the bovine adrenal: Their modification by substrates and inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **499**(3), 432-442.

**Yam, K. C., D'Angelo, I., Kalscheuer, R., Zhu, H., Wang, J.-X., Snieckus, V., Ly, L. H., Converse, P. J., Jacobs, W. R., Jr., Strynadka, N. and Eltis, L. D. (2009).** Studies of a Ring-Cleaving Dioxygenase Illuminate the Role of Cholesterol Metabolism in the Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* **5**(3), e1000344

**Yang, X., Dubnau, E., Smith, I. and Sampson, N. S. (2007).** Rv1106c from *Mycobacterium tuberculosis* Is a 3- $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *Biochemistry* **46**(31), 9058-9067.

**Yu, Z., Reichheld, S. E., Savchenko, A., Parkinson, J. and Davidson, A. R. (2010).** A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *Journal of Molecular Biology* **400**(4), 847-864.